

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許出願公告番号

特公平6-87788

(24) (44)公告日 平成6年(1994)11月9日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/02	Z N A C	8214-4B		
C 1 2 N 15/12				
15/62				
15/70				
// (C 1 2 P 21/02				

請求項の数9(全 26 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願昭63-49723
 (22)出願日 昭和63年(1988)3月4日
 (65)公開番号 特開平1-10999
 (43)公開日 平成1年(1989)1月13日
 (31)優先権主張番号 特願昭62-47796
 (32)優先日 昭62(1987)3月4日
 (33)優先権主張国 日本 (J P)

微生物の受託番号 FERM BP-282
 微生物の受託番号 FERM BP-283
 微生物の受託番号 FERM BP-320
 微生物の受託番号 FERM BP-535
 微生物の受託番号 FERM BP-1253
 微生物の受託番号 FERM BP-1748

(71)出願人 999999999
 サントリー株式会社
 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
 (72)発明者 孫田 浩二
 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号
 サントリー株式会社生物医学研究所内
 (72)発明者 大島 武博
 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号
 サントリー株式会社生物医学研究所内
 (72)発明者 田中 正治
 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号
 サントリー株式会社生物医学研究所内
 (74)代理人 弁理士 青木 朗 (外4名)

審査官 田中 久直

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 システイン残基を含有する生理活性ペプチドの製造方法

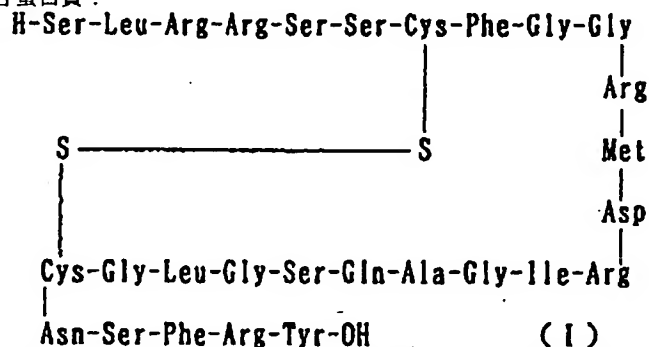
【特許請求の範囲】

A-L-B

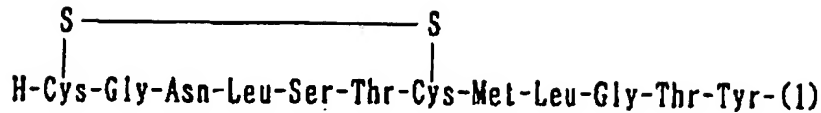
【請求項1】システイン残基を含有する生理活性ペプチド(目的ペプチド)の製造方法であって、

【式中、
 Bは目的ペプチドであって、次の式(1)：

A) 次の式で表わされる融合蛋白質：



で表されるアミノ酸配列を有するペプチド(αhANP)で あるか、あるいは次の式(II)：



(2)-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-(3)

(4)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-OH

〔このアミノ酸配列において(1)と(2)及び(3)と(4)は直接つながっている〕

で表わされるアミノ酸配列を有するヒトカルシトニン前駆体であり；

Aは、大腸菌β-ガラクトシダーゼのN-末端の90～220個のアミノ酸残基を有するポリペプチドであって、それに含まれる生来のシステイン残基が他のアミノ酸残基に置き換えられたもの（付加ポリペプチド）であり；そして

Lは、該付加ポリペプチドのC-末端と該目的ペプチドのN-末端との間に位置するアミノ酸残基（リンカー）であり、該リンカーアミノ酸残基は該目的ポリペプチド中には存在せず、且つ該融合蛋白質を酵素又は化学物質により処理した場合に前記目的ペプチドが切り離される様に選択されたものである〕

を大腸菌由来のプロモーターまたはファージ遺伝子由来のプロモーターの支配下に発現することができるプラスミドにより形質転換された大腸菌を培養し、

B) 該大腸菌形質転換体の培養菌体を破碎して不溶性画分を得、次にこの不溶性画分を可溶化剤で処理することにより前記融合蛋白質を可溶化し、そして

C) 該可溶化された融合蛋白質を、前記リンカーアミノ酸残基のC-末端と前記目的ペプチドのN-末端との間のペプチド結合を切断することができる酵素により処理するか、又は前記リンカーアミノ酸残基を分解することができる化学物質により処理することにより、前記目的ペプチドを付加ポリペプチドから切り離し、そして該目的ペプチドを採取する、ことを特徴とする方法。

【請求項2】前記付加ポリペプチドが、大腸菌β-ガラクトシダーゼのN-末端の210個のアミノ酸残基に所望により1個又は複数個のアミノ酸残基が追加されたポリペプチドであって、それに含まれる生来のシステイン残基が他のアミノ酸残基により置き換えられているものである、請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】前記付加ポリペプチドが、大腸菌β-ガラクトシダーゼのN-末端の97個のアミノ酸残基に所望により1個又は複数個のアミノ酸残基が追加されたポリペプチドであって、それに含まれる生来のシステイン残基が他のアミノ酸残基により置き換えられているものである、請求項1に記載の製造方法。

【請求項4】前記他のアミノ酸残基がセリン残基である請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】前記リンカーアミノ酸残基がリジン残基で

あり、そして前記酵素がリシルエンドペプチダーゼである請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】前記リンカーアミノ酸残基がアルギニン残基であり、そして前記酵素がクロストリパインである請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】前記リンカーアミノ酸残基がグルタミン酸残基であり、そして前記酵素がV₈プロテアーゼである請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】前記リンカーアミノ酸残基がメチオニン残基であり、そして前記化学物質が臭化シアンである請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】前記プロモーターが大腸菌ラクトース遺伝子由来のプロモーター、ラムダ(λ)ファージ遺伝子由来のP_Lプロモーターまたは、大腸菌外膜リポタンパク質遺伝子由来のlppプロモーターである請求項1～8のいずれか1項に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は、システイン残基を含有する生理活性ペプチド（本発明において目的ペプチドと称する場合がある）の製造方法に関する。

【従来の技術】

これまで、組換えDNA技術を用いて、真核生物由来の生理活性ペプチドまたは蛋白質を大腸菌等の微生物で生産させようとする試みが多くなされている。

例えば、大腸菌等の微生物内で分解を受け易い比較的分子量の小さいペプチドを生産しようとする場合、目的とするペプチドを他の蛋白質又はポリペプチドとの融合蛋白として生産させた後、化学的あるいは酵素的な処理を行い、その融合蛋白から目的とするペプチドを切り出し精製する方法が、一般に用いられている。

融合蛋白から目的のペプチドを切り出す方法としては、目的のペプチドがメチオニン残基を含まない場合には、目的ペプチドをメチオニン残基を介した融合蛋白として生産した後、臭化シアン(CNBr)処理によりメチオニン残基を開裂させて目的のペプチドを切り出す方法(Science 198, 1059 (1977)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 106 (1978))が用いられており、目的のペプチドにアルギニン(Arg)やリジン(Lys)残基を含まない場合には、アルギニンやリジン残基のC末端(カルボキシル末端)を特異的に切断するトリプシン処理で目的のペプチドを切り出す方法(Nature, 285, 456 (1980))などが用いられている。また、リジン残基のC末端を特異的に

切断する酵素（リシルエンドペプチダーゼ）として知られているアクロモバクター（*Achromobacter*）プロテアーゼ I（以下APIと略す：特公昭54-135789参照）も、場合により目的ペプチドの切り出しに用いることができる。

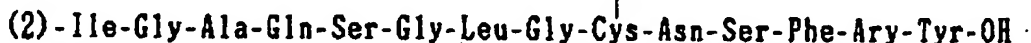
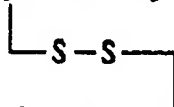
目的のペプチドとの融合の相手となるポリペプチド（本発明においては付加ポリペプチドと称する場合がある）には、用いる宿主微生物が本来的に生産する蛋白質の断片がよく用いられている。この場合、通常、用いる宿主微生物で高生産する蛋白質のN末端（アミノ末端）からの適当な大きさ（長さ）をもつポリペプチド断片が用いられているが、そのポリペプチド断片の大きさが、目的のペプチドの生産性に影響を及ぼすことが考えられる。例えば、該付加ポリペプチド領域を小さく（短かく）して融合蛋白質に対する目的のペプチドの割合をふやして生産性を向上させることが考えられるが、必ずしも該ポリペプチド領域を小さくしても目的ペプチドの生産性が向上するとは限らない。例えば、大腸菌β-ガラクトシダーゼを融合蛋白質の相手として使用するインスリン生産の場合、β-ガラクトシダーゼ領域の縮小により、目的のペプチドの生産量が一旦上昇するが、さらに小さくす

ると生産量が低下することが報告されている（Gene, 29, 251 (1984)）。このように、融合蛋白質としてある特定のペプチドを生産しようとする場合、融合の相手となるポリペプチドがどれくらいの大きさであればよいかという定説はない。

以上、組換えDNA技術を用いてペプチドを生産する一般方法について述べたが、この製造法で一番重要な点はいかにして目的ペプチドに最適な付加ポリペプチドを選定し、目的ペプチドを融合蛋白質として効率良く発現させ目的ペプチドを融合蛋白質から回収するかである。しかし、この点に関しては現在の技術では一般法は確立しておらず、個々の目的ペプチドにおいて最適化せざるをえない。

以下、システイン残基を含有する生理活性ペプチド（目的ペプチド）製造方法の対象として、α-type human atrial natriuretic poly peptide（以下α-hANPと略す）及びhuman calcitonin precursor（以下HPCTと略す）を示し、これらペプチドの組換えDNA技術を用いての製造方法における問題点をより具体的に述べる。

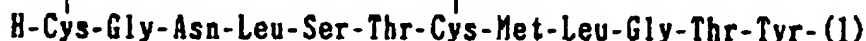
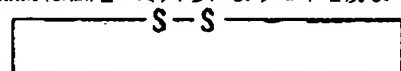
α-hANP、次の式（I）：



（このアミノ酸配列において（1）と（2）は直接つながっている）で表わされる28個のアミノ酸残基からなるペプチドで、7位と23位に存在する2個のシステイン残基は分子内でS-S結合（ジスルフィド結合）を形成している。α-hANPは松尾・寒川らによりヒト心房よ

り抽出・精製され、その構造が明らかにされ又このペプチドは顕著なナトリウム利尿作用や血圧降下作用を有していることが判っている（Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 131~139, 1984）。

一方、HPCTは次の式（II）：



【このアミノ酸配列において（1）と（2）及び（3）と（4）は直接つながっている】で表わされる36個のアミノ酸残基から成るペプチドで、1位と7位に存在する2個のシステイン残基は分子内でS-S結合（ジスルフィド結合）を形成している。

HPCTはヒト・カルシトニン（式IIで示される1~32位のアミノ酸配列を有し、そのC末端Proのα位カルボキシル基はアミド化されている。）が生成合される過程の中間体として知られている（Nature 295, 345-347）。

現在、これらのペプチドはいずれも化学合成により製造されうるが、大量に最終精製品を得るには多くの労力と時間を要する。したがって、特にこれらのペプチドを医

薬品に応用する場合、より簡便で大量に、しかも安価に製造する方法の確立が強く望まれる。

最近、この問題を解決する方法として、組換えDNA技術を用いてこれらのペプチドを製造しようとする試みもなされている。例えばα-hANPにおいては、α-hANPを320~340個のアミノ酸残基から成る大腸菌TrpE蛋白質との融合蛋白質として発現させ、菌体破碎液から粗抽出した融合蛋白質をリシルエンドペプチダーゼや血液凝固因子ファクターXaで処理して、融合蛋白質からα-hANPを遊離させている

（昭和60年生化学会大会要旨：生化学57（8）、854（1984））。しかしながら、この方法は精製行程が複雑で、融合蛋白質からの目的ペプチドの回収率も悪く、α

hANPの実質的製造法とは言えない。さらに、本発明者等は先に、 α hANPで代表されるリジン残基を含有しない生理活性ペプチドを製造するに当り、目的とする生理活性ペプチドの融合の相手ポリペプチドとしてリジン残基を含有しない90~220個のアミノ酸残基からなるポリペプチドを用い、これらを、リジン残基を介して目的ペプチドと連結させた融合蛋白として発現させ、次にこれらをリシルエンドペプチダーゼにより水解することにより、目的の生理活性ペプチドをより効率的に製造することを見出した(特願昭61-101100号)。しかしながら、このような改良された方法においても、最初に発現させた融合蛋白から目的ペプチドを回収する効率はかならずしも満足できるものではなかった。

一方、HPCTの組換えDNA技術を用いる製造法に関しては、本発明者等により、HPCTの誘導体〔式(II)で示されるHPCTのアミノ酸配列で8位メチオニン残基がバリン残基に変換した誘導体〕に関する製造法が報告されている(特開昭58-203953)。この製造法においてはまず目的ペプチドを大腸菌アルカリホスファターゼとの融合蛋白質として発現させた後、この融合蛋白質を臭化シアン処理することにより、目的ペプチドを得ている。しかしながら、この方法においても先に述べた α hANP製造法と同様、最初に発現させた融合蛋白から、目的ペプチドを回収する効率はかならずしも満足できるものではなかった。一方、これらの例に対し、一般にシステイン残基を含有しないペプチドの組換えDNA技術による製造においては、融合蛋白質から目的ペプチドを回収する効率はシステイン残基を含有するペプチドのそれに比べ良いこと

が知られている。したがって、組換えDNA技術を用いシステイン残基を含有するペプチドを効率良く製造するためには、いかにして融合蛋白質から目的ペプチドを効率良く回収するかが問題となっており、現在、この点に関する解決策が望まれている。

〔発明が解決しようとする課題〕

従って本発明は、システイン残基を含有する生理活性ペプチドを効率的に大量生産することができる方法を提供しようとするものであり、特に、本発明においては、これらのペプチドに最適な付加ペプチドの選定に関する方法を提供しようとするものである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者等は、前記の問題点の解決方法を種々検討した結果、目的ペプチドと付加ペプチドが共にシステインを含有する場合に目的ペプチドの回収率が若干低くなるのは、目的ペプチド中のシステインと付加ポリペプチド中のシステインとの間にジスルフィド結合が形成されるためであることを初めて実験的に明らかにし、システイン残基を含有しない付加ポリペプチドを用いることにより前記の問題点が解決されるという全く新しい知見を得、この知見に基いてこの発明を完成した。

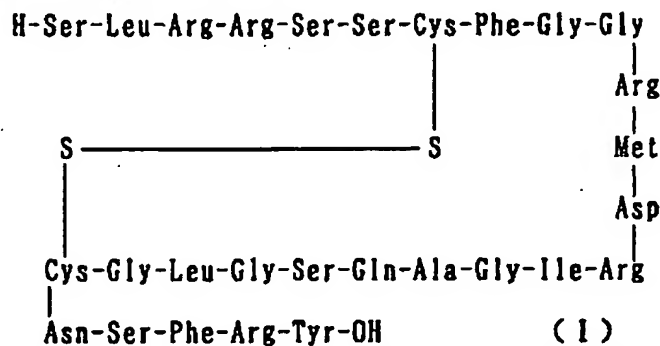
従って本発明は、システイン残基を含有する生理活性ペプチド(目的ペプチド)の製造方法であって、

A) 次の式で表わされる融合蛋白質:

A-L-B

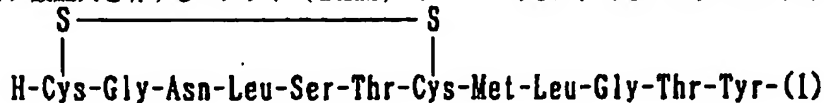
〔式中、

Bは目的ペプチドであって、次の式(I):



で表されるアミノ酸配列を有するペプチド(α hANP)で

あるか、あるいは次の式(II):



(2)-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-(3)

(4)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Lys-Arg-OH

〔このアミノ酸配列において(1)と(2)、及び

(3)と(4)は直接つながっている〕

で表わされるアミノ酸配列を有するヒトカルシトニン前駆体であり;

Aは、大腸菌 β -ガラクトシダーゼのN-末端の90~220個のアミノ酸残基を有するポリペプチドであって、それに含まれる生来のシステイン残基が他のアミノ酸残基に置き換えられているもの(付加ポリペプチド)であ

り；そして

Lは、該付加ポリペプチドのC-末端と該目的ペプチドのN-末端との間に位置するアミノ酸残基（リンカー）であり、該リンカーアミノ酸残基は該目的ポリペプチド中には存在せず、且つ該融合蛋白質を酵素又は化学物質により処理した場合に前記目的ペプチドが切り離される様に選択されたものである]

を大腸菌由来のプロモーターまたはファージ遺伝子由来のプロモーターの支配下に発現することができるプラスミドにより形質転換された大腸菌を培養し、

B) 該大腸菌形質転換体の培養菌体を破碎して不溶性画分を得、次にこの不溶性画分を可溶化剤で処理することにより前記融合蛋白質を可溶化し、そして

C) 該可溶化された融合蛋白質を、前記リンカーアミノ酸残基のC-末端と前記目的ペプチドのN-末端との間のペプチド結合を切断することができる酵素により処理するか、又は前記リンカーアミノ酸残基を分解することができる化学物質により処理することにより、前記目的ペプチドを他のポリペプチドから切り離し、そして該目的ペプチドを採取する、ことを特徴とする方法を提供するものである。

【具体的な説明】

本発明は、 α -hANP及びHPCTの製造方法に関する。

目的の生理活性ペプチドの融合の相手方ポリペプチド（付加ポリペプチド）としては、例えば、天然ポリペプチド又はその部分に対応し、該天然ポリペプチド又はその部分にシステイン残基が含まれる場合には該システイン残基が他のアミノ酸残基により置き換えられており、そして場合によってはさらに1個又は複数個のアミノ酸残基が付加されたものを挙げることができ、例えば大腸菌 β -ガラクトシダーゼ蛋白質のN末端側の90~220個のアミノ酸残基から成るポリペプチドを挙げるができる。具体例として、大腸菌 β -ガラクトシダーゼのN末端から210位のアミノ酸残基までのポリペプチドと2個の追加のアミノ酸残基、例えばグルタミン酸及びフェニルアラニンとから成る付加ペプチド、及び大腸菌の β -ガラクトシダーゼのN末端から97位のアミノ酸残基までのポリペプチドと2個の追加のアミノ酸残基、例えばグルタミン及びフェニルアラニンとからなる付加ペプチド、さらには大腸菌の β -ガラクトシダーゼのN末端から97位のアミノ酸残基までのポリペプチドと3個の追加のアミノ酸残基、例えばグルタミン酸、フェニルアラニン及びロイシンとからなる付加ペプチド、を挙げるができる。これらの追加のアミノ酸残基は、例えば遺伝子操作においてリンカーDNAに対応するアミノ酸又はペプチドとして導入される。90~220個のアミノ酸残基から成るポリペプチドが好ましいことは、本発明者等によりすでに見出されている（特願昭61-101100号）。しかしながら、このペプチド領域にはシステイン残基が含まれているから、これを除去するか又は他のアミノ酸と置

き換えなければならない。これはプライマーを用いる部位特異的変異により容易に実施することができる。システインに代るアミノ酸としては特に限定されないが、リジンは好ましくなく、例えばセリンを用いるのが好ましい。大腸菌 β -ガラクトシダーゼ蛋白質由来のポリペプチド領域には天然形態においてはリジン残基が存在しないため、融合蛋白質をリシルエンドペプチダーゼにより切断する場合に該ポリペプチドが細断されず、このため目的のペプチドの単離・精製が極めて容易になるという追加の利点が得られる。

本発明方法においては、目的の生理活性ペプチドのN末端が付加ポリペプチドのC末端にリンカーアミノ酸残基を解して連結された融合蛋白質として該目的ペプチドを発現せしめる。このリンカーアミノ酸としては、例えばリジン、アルギニン、グルタミン酸、メチオニン等を挙げるができる。このリンカーアミノ酸がリジンである場合、目的ペプチドと該リジンとの間の結合をリシルエンドペプチダーゼにより切断し、目的ペプチドを遊離せしめる。また、リンカーアミノ酸がアルギニンである場合には、目的ペプチドと該アルギニンとの間の結合を例えばクロストリパインにより切断し、目的ペプチドを遊離せしめる。また、リンカーアミノ酸がグルタミン酸である場合には、目的ペプチドと該グルタミン酸との間の結合を、例えば V_8 プロテアーゼにより切断し、目的ペプチドを遊離せしめる。さらに、リンカーアミノ酸がメチオニンである場合、臭化シアンによって該メチオニンを分解することにより目的ペプチドを遊離せしめる。

リジン残基又はグルタミン酸残基を介して形成された融合蛋白は、付加ポリペプチド、例えば β -gal断片、をコードするDNA配列と目的ペプチドをコードするDNA配列との間に、翻訳開始コドンからの読み枠が合うようにデザインされたリジン又はグルタミン酸のコドンを含む合成リンカー（二重鎖DNA）を挿入した遺伝子を発現させることにより得られる。この場合、該リンカーは、リジン又はグルタミン酸のコドンのすぐ下流に目的ペプチドのN末端の一部のアミノ酸配列をコードするDNA配列を有し、両端には連結しやすい塩基配列、例えば適当な制限酵素サイトを含んでいるのが好ましい。

β -ガラクトシダーゼをコードする遺伝子の入手源としては、例えばlacプロモーターのもとに β -ガラクトシダーゼの遺伝子を含有するプラスミドp α NE2を使用することができる。また、目的の生理活性ペプチドとしての α -hANPをコードする遺伝子の入手源としては、 α -hANPの前駆体である γ -hANPをコードする遺伝子を含有するプラスミドpS224-3を用いることができる。さらに、HPCTをコードする遺伝子の作製にはプラスミドpAHPCT38を用いることができる。

融合蛋白遺伝子を高発現させるためのプロモーターとしては、大腸菌或いはファージで高生産できる蛋白質の遺伝子のプロモーターであれば限定はされないが、本発明

では、特に大腸菌ラクトース遺伝子由来のプロモーター (lac)、外膜リポタンパク質遺伝子由来のlppプロモーター、或いはλファージ遺伝子由来のPlプロモーターが好ましい。これらのプロモーター領域は、公知のプラスミドから通常の遺伝子組換え手法により容易に得ることができる。例えば、本発明ではPlプロモーターは、pPl lacZ' 210αhANPから(第8図参照)、lppプロモーターはpIN5T4(第9図参照)から容易に導入することができる。これらのプラスミドについては各々特願昭61-101100号、及び特開昭61-132186に記載され、pPl lacZ' 210αhANPの材料となるプラスミドpS20が組込まれた大腸菌(N4830/pS20)は、微生物研条菌第535号(FERM BP-535)として、pIN5T4の材料となるプラスミドpINI-A2が組込まれた大腸菌(JA221/pINI-A2)は微生物研条寄第320号(FERM-BP320)として、各々工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。

融合蛋白は、その遺伝子の直後にトリプトファンオペロンのアデニューエーターミネーター(以下trp aと略す)を挿入することによりさらに高発現させることができる。例えば、実施例に示すように(第4図参照)lacプロモーター支配下に融合蛋白を発現するプラスミドpGHα97(Ser)rop⁻のαhANP遺伝子の直後にtrp aを挿入することにより(pGHα97S)、目的とする融合蛋白の生産性を大巾に向上させることができる。

目的の生理活性ペプチドをコードする遺伝子は化学的に合成してもよいし、そのペプチド(或いは、そのペプチドの前駆体)を産生している細胞から得られるmRNAを逆転写してつくられるcDNAを用いてもよい。

なお本発明においてはα-hANPをコードする遺伝子の入手源としてlacプロモーターのもとにα-hANP遺伝子を含むプラスミドpGHα210rop⁻、及びプラスミドpGHα439rop⁻を使用するが、これらのプラスミドの詳細は特願昭61-101100明細書中に記載されており、また本明細書において参考例として記載する。

本発明の製造法における融合蛋白からの目的ペプチドの切り出しには、リンカーアミノ酸がリジンである場合、リジン酸基のC末端を特異的に切断する酵素、すなわちリシルエンドペプチダーゼが用いられる。特に、アクロモバクター・リティカス(Achromobacter lyticus)由来のアクロモバクタープロテアーゼI(ASIと略す)と呼ばれる酵素が好ましい[和光純薬(株)より発売されている。]一方、リンカーアミノ酸がグルタミン酸である場合、グルタミン酸残基のC末端を特異的に切断する酵素、すなわちV₈プロテアーゼを用いることができる。大腸菌内で生産される融合蛋白は、菌体破碎懸濁液の上清から抽出される場合と、沈殿(不溶)画分から抽出される場合とが考えられるが、本発明では、目的融合蛋白以外の夾雑蛋白又はペプチドの混在が少ない不溶画分から可溶化剤、例えば5M~10M濃度の尿素溶液で抽出される。不溶画分から融合蛋白の抽出(可溶化)にはSDS

や塩酸グアニジンなどの試薬も考えられるが、5Mの濃度でも融合蛋白が可溶化された状態であり且つAPI酵素活性が失われない尿素の溶液で抽出するのが好ましい。例えば、8M尿素溶液で不溶画分から目的融合蛋白を可溶化後、適当な緩衝溶液で希釈するだけで、何ら精製工程を経ることなくAPIを作用させ、目的ペプチド、例えば分子内S-S結合を有したαhANPを遊離させることができる。遊離された目的ペプチドは、通常の方法で精製される。

[発明の効果]

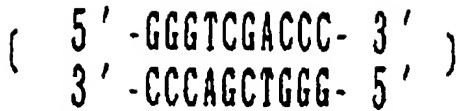
本発明では上記のように、①目的融合蛋白を不溶画分から抽出するため、該抽出液にはほとんど目的融合蛋白以外の夾雑蛋白が存在せず、②該抽出液に含まれる目的融合蛋白を何ら精製することなくAPI処理し目的ペプチドを遊離させることができ、さらに③融合蛋白分子中に占める目的ペプチド分子の割合が高いことなどから、従来の方法に比べ、はるかに簡便で且つ効率よく目的ペプチドとする生理活性ペプチドを製造できる。また、付加ポリペプチドがシステインを含有しないため、これらのペプチド間にジスルフィド結合が形成されることがないから、目的の生理活性ペプチドの切り出しが極めて高収率で行われる。また、前記付加ポリペプチドがリジン残基を含有しない本発明の態様においては、リシルエンドペプチダーゼによる目的生理活性ペプチドの切り出しに際して相手方ポリペプチドが切断されることがないから、目的生理活性物質の単離・精製が極めて容易になる。次に、参考例及び実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

まず、本発明の方法に使用するプラスミドの作製のための出発材料となるプラスミド、すなわち、β-ガラクトシダーゼ蛋白質の部分とα-hANPとの融合蛋白質であってβ-ガラクトシダーゼ蛋白質部分にシステイン残基を含有しているもの(天然形態において存在するシステイン残基がまだ他のアミノ酸残基により置き換えられていないもの)をコードするDNAを含むプラスミドpGHα210rop⁻、pGHα439rop⁻、及びplacZ' 210αhANPの作製方法を記載する。

参考例1.pGHα1007の作製(第11図):融合蛋白発現プラスミドの作製

A.pBR322-SalIの作製

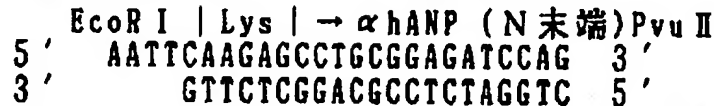
pBR322 5μgをHindIII buffer (50mM NaCl、50mM トリス塩酸(pH8.0)、10mM MgCl₂) 50μl中で16ユニットのEcoRIにより完全分解した後、エタノール沈殿によりDNAを回収し、次に25mM dNTPs (dATP、dGTP、dCTP、dTTPを含む) 2μlを含むTA緩衝液(33mM トリス酢酸pH7.9、66mM 酢酸カリウム、10mM 酢酸マグネシウム、0.5mM ジチオスレイトール) 100μl中で4ユニットのT4 DNAポリメラーゼによりEcoRI粘着末端を平滑末端とした。その後、エタノール沈殿によりDNAを回収し、SalIリンカー



0.5 μ g を加えたライゲーション反応液 (20mM トリス塩酸 pH7.4、10mM MgCl₂ 10mM ジチオスレイトール、1mM ATP) 20 μ l 中、1 ユニットの T4 DNA リガーゼとともに 15°C 18 時間反応させた。この反応液を大腸菌 W3110 に形質転換し、アンピシリン、テトラサイクリン薬剤耐性 (Ap^r, Tcr) クローンを得た。次に、これらのクローンからプラスミドを分離して制限酵素による解析を行ない、EcoRI サイトが SalI サイトに変わった pBR322-SalI を得た。

B. pGH α 201 の作製

5 μ g の pBR322-SalI を SalI 緩衝液 (150mM NaCl 6mM トリス塩酸 pH7.9、6mM MgCl₂) 50 μ l 中で、8 ユニットの SalI で部分消化した後、24 ユニットの BamHI で完全消化を行ない、寒天ゲル電気泳動により、2 番目に大きいテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター領域を含む DNA 断片 (第11図の①) を分離、回収した。また、p α N



1 μ g を混合し、前述の方法でライゲーションした後、W3110 への形質転換を行ないアンピシリン及びテトラサイクリン耐性のクローンを得た。常法に従ってこれらのクローンからプラスミドを分離して解析し、目的とする pGH α 201 を得た。

C. pGH α 1007 の作製

5 μ g の pGH α 201 を SalI 緩衝液 50 μ l 中で 24 ユニットの DraI で完全消化した後、電気泳動的に一番大きい DNA 断片を分離し、回収した。次に前述の方法でライゲーションした後、大腸菌 W3110 への形質転換を行ない、アンピシリン感受性でテトラサイクリン耐性のクローンを得た。常法に従って解析し、目的とする pGH α 1007 を得た。この pGH α 1007 は、 β -gal (1007 個のアミノ酸からなる蛋白) の C 末端に Lys を介して α hANP が連結された融合蛋白 (β gal1007 α hANP と呼ぶ) がラクトースプロモーター (plac) 支配下に発現されるプラスミドである。

尚、本プラスミドが導入された大腸菌 W3110/pGH α 1007 は SBM284 と命名され、微工研菌寄第 8728 号 (FERM P-8728) の受託番号のもとに工業技術院微生物工業技術研究所に寄託され、微工研条寄第 1748 号 (FERM BP-1748) としてブタペスト条約に基く国際寄託に移管された。

参考例 2. pGH α 650、pGH α 439 及び pGH α 210 の作製 (第12図) - β gal の縮小化

5 μ g の pGH α 1007 を TA 緩衝液 50 μ l 中で 8 ユニットの EcoRI 及び 24 ユニットの SacI で完全消化した後、電気泳動的に一番大きい DNA 断片を分離し、回収した。次に前述のようにして EcoRI 及び SacI 粘着末端を平滑末端とした

E2 (本プラスミドは特開昭 58-63395 に開示されている。さらに本プラスミドによって形質転換された大腸菌 WA80 2/p α NE2 株は、SBM102 と命名、工業技術院微生物工業技術研究所に受託番号 EERM P-6031 として寄託されている) 5 μ g を SalI 緩衝液 100 μ l 中で、24 ユニットの BamHI、および 24 ユニットの EcoRI で完全消化した後、電気泳動的に一番大きい lac プロモーターにて発現する β -gal1007、及びアンピシリン耐性遺伝子を含む DNA 断片 (第11図の②) を分離、回収した。さらに λ hANP 遺伝子 (その 3' 末側に α hANP 構造遺伝子をもつ) を含む pS22 4-3 (特開昭 60-262592 に開示) 5 μ g を SalI 緩衝液 100 μ l 中で 24 ユニットの PvuII、及び 80 ユニットの SalI で完全消化した後、N 末端を欠く α hANP 遺伝子を含む電気泳動的にもっとも小さい DNA 断片 (第11図の③) を分離、回収した。前述の①～③の DNA 断片及び Lys 残基と α hANP の N 末端領域の一部をコードする遺伝子を含み且つ各々の末端にそれぞれ EcoRI 粘着部位および PvuII 平滑部位を有する以下の塩基配列で示される化学合成 DNA 断片 (第11図の④) :

後、ライゲーションし、大腸菌 W3110 への形質転換を行ない、テトラサイクリン耐性のクローンを得た。常法に従って解析し、目的とする pGH α 650 を得た。

pGH/ α 439、及び pGH α 210 の作製は、TA 緩衝液を HindIII 緩衝液に、24 ユニットの SacI をそれぞれ 24 ユニットの MluI 及び 24 ユニットの AatII に換え、同様に行なった。

尚、pGH α 650、pGH α 439、及び pGH α 210 は、各々 β -gal 蛋白の N 末端から 650 個、439 個、210 個のアミノ酸からなるポリペプチドの C 末端に Glu-Phe の 2 アミノ酸と Lys 残基を介して α hANP が連結された融合蛋白 (各々 β gal650 α hANP、 β gal439 α hANP、及び β gal210 α hANP と呼ぶ) をコードする DNA 断片が含まれているプラスミドであることを示す。

参考例 3. pGH α 210rop⁻ の作製 (第13図)

A) pBR322 Δ BalI の作製

5 μ g の pBR322 を BalI 緩衝液 (10mM トリス塩酸 pH7.6、12mM MgCl₂) 50 μ l 中で、10 ユニットの BalI で完全に消化した後、エタノール沈澱により DNA を回収した。次に DNA を SalI 緩衝液 50 μ l に溶解して 24 ユニットの PvuII で完全消化した後、電気泳動的に一番大きい DNA 断片 (BalI 及び PvuII 消化により DNA 断片の両端は、平滑末端となっている) を分離、回収した。前述のようにライゲーション及び形質転換を行ない、テトラサイクリン及びアンピシリン耐性のクローンを得、PvuII-BalI 622 塩基 DNA 断片の欠失したプラスミド pBR322 Δ BalI を得た。

B) pGH α 210rop⁻ の作製

5 μ g の pBR322 Δ BalI を SalI 緩衝液 50 μ l 中で、24 ユニットの DraI 及び 24 ユニットの EcoRV で完全消化後、複製

起点を含む電気泳動的に一番大きいDNA断片を分離、回収した。次に5 μ gのpGH α 210をSalI緩衝液50 μ l中で24ユニットのEcoRVで完全消化した後、電気泳動的に2番目に大きい β gal210 α hANP融合蛋白をコードする遺伝子を含むDNA断片を分離、回収した。これらのDNA断片を前述のようにライゲーションした後、大腸菌W3110への形質転換を行ない、テトラサイクリン耐性のクローンを得た。常法に従って解析し、目的のクローンW3110/pGH α 210rop⁻を得た。本プラスミドpGH α 210rop⁻はプラスミドの複製を制御(抑制)する領域(ropと呼ばれる)の機能が欠如したプラスミドである。

pGH α 439についても同様にしてrop機能を欠如したプラスミドpGH α 439rop⁻を作製し、そのプラスミドによって形質転換された大腸菌W3110/pGH α 439rop⁻およびpGH α 210rop⁻によって形質転換された大腸菌W3110/pGH α 210rop⁻について各々の融合蛋白すなわち β gal439 α hANPと β gal210 α hANP、の生産性をSDS PAGEによって調べた。その結果、特に、pGH α 210において、rop機能を欠如させることにより、融合蛋白の生産性の大幅な上昇が観察された。尚、生産量が少ない場合、IPTG添加効果が顕著に現われるが、rop機能を欠損させプラスミドコピー数を増加させるとその効果はあまりないことがわかる。

参考例4. pPl lacZ' 210 α hANPの作製

次に、pGH α 210のlacプロモーターを λ ファージ由来のP_Lプロモーターに変換したプラスミドpPl lacZ' 210 α hANPの作製を行った。

A) pGH α 210-EcoRIの作製(第14図)

Morinaga, Y.ら(Biotechnology 2:636, 1984)の方法に準じて、pGH α 210上のlacZ' 遺伝子の直前にEcoRIサイトを挿入したプラスミドpGH α 210-EcoRIを作製した。即ち、まず、5 μ gのpGH α 210をTA緩衝液50 μ l中で、24ユニットのHpaIにより完全消化した後、電気泳動的に一番大きい α hANP構造遺伝子及びテトラサイクリン耐性遺伝子(Tc^r)を含むDNA断片(第14図中の①)を分離、回収する。その後、100mM トリス塩酸(pH8.0) 50 μ l中

(SalI)

```

5' TCGACAGCCCGCCTAATGAGCGGCTTTTTTTTCTGC 3'
3' GTCGGGCGGATTACTCGCCGAAAAAAAAGACGAACC 5'
(AvaI)

```

をライゲーションした後、大腸菌W3110/C1に形質転換、アンピシリン及びカナマイシン耐性のクローンを得た。常法に従って解析し、目的のクローンを得た。

参考例5. β -gal領域を縮小したプラスミドpGH α Balの作製

続いて、pGH α 439rop⁻を用いて融合蛋白中の β -gal領域が縮小化したプラスミドを作製し、 β -gal領域の大きさがどれくらいであれば β gal α hANP融合蛋白の生産に有効であるかを検討した。

(A) pGH α Balの作製(第16図)

10 μ gのpGH α 439rop⁻はHindIII緩衝液100 μ l中で、10

でアルカリ性フォスファターゼ処理により、5'末端のリン酸を除く。次に5 μ gのpGH α 210をSalI緩衝液50 μ l中で、80ユニットのSalIで完全消化した後、電気泳動的に一番大きいテトラサイクリン耐性遺伝子の一部を欠失したDNA断片(第14図中の②)を分離、回収した。この両DNA断片①及び②と、EcoRIサイトを有し、かつ以下の塩基配列を有する5'末端がリン酸化された化学合成一本鎖DNA(第14図中の③)：

```

5' pGGATAACAATTTACACAGGAAGAAATTCATGACCATGATTACGG
3'

```

とを混合し、95℃で二重鎖DNAを変性させて一本鎖のDNAとした後、ゆっくり冷却し、アニーリング(対合)させることにより二重鎖形成を行なった。この反応液にdNTPsとDNAポリメラーゼ(Klenow断片)、およびT4 DNAリガーゼとATPを加えて反応させることにより完全な環状二重鎖DNAとした。この反応液を用いて大腸菌W3110を形質転換し、テトラサイクリン耐性を示すクローンを得た。常法に従って解析しlacZ' 遺伝子の直前にEcoRI部位が挿入された目的のプラスミドpGH α 210-EcoRIを得た。

B) pPl lacZ' 210 α hANPの作製(第15図)

前述のプラスミドpGH α 210-EcoRI 5 μ gをHindIII緩衝液50 μ l中で0.2ユニットのEcoRIで部分消化した後、電気泳動的にリニアのDNA断片を分離、回収した。さらに、このDNAをSalI緩衝液100 μ l中で、80ユニットのSalIで完全消化した後、電気泳動的に2番目に大きい、 β gal210 α hANP構造遺伝子を含むDNA断片(第15図中の①)を分離、回収した。次に5 μ gのpS224-3(前述)をHindIII緩衝液50 μ l中で16ユニットのEcoRI及び24ユニットのAvaIで完全消化した後、 λ ファージのP_Lプロモーター及びアンピシリン耐性遺伝子を含む電気泳動的に一番大きいDNA断片(第15図中の②)を分離、回収した。この両DNA断片①及び②と、各々の末端にSalI粘着部位及びAvaI粘着部位を有し、かつ以下のDNA塩基配列を有する化学合成DNA断片(ターミネーターtrpa)(第15図中の③)：

0ユニットのAatIIで完全に消化した後、エタノール沈澱によりDNAを回収した。次に、DNAをBa131緩衝液(12mM CaCl₂、12mM MgCl₂、0.2M NaCl、20mM Tris/HCl、1mMED TA (pH8.0)) 100 μ lに溶解して10ユニットのBa131で5分、10分、20分後に各々30 μ lの溶液をとり同量のフェノール-クロロホルム1:1を溶液で処理することによりBa131の反応を停止させた。次にフェノール層(下層)を除いた後、残留するフェノールをエーテルで抽出し、さらにエタノール沈澱によりDNAを回収した。続いて各々のDNAをTA緩衝液30 μ lに溶かしたのち、15ユニットのEcoRIで完全に消化し、そのうち10 μ lを2%ア

ガロースゲル電気泳動を行った。このうち400塩基対以下のDNA断片が生じた10分、20分処理のサンプルの残りの20 μ lにTA緩衝液70 μ l及び25mM dNTP 2 μ l、100mM ジチオスレイトール5 μ l、4ユニットのT4 DPaseを加え反応させることによりDNA末端を平滑末端とした。次に、エタノール沈澱により各々のDNAを集めた後、前述のようにライゲーション及び大腸菌W3110株への形質転換を行ない54株のW3110/pGH α Balクローンを分離した。この内プラスミドpGH α Bal43を本発明のプラスミドの作製のため出発材料として使用した。

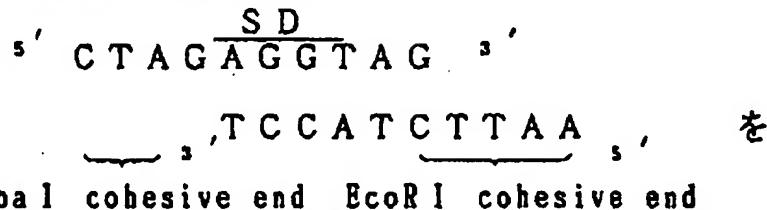
参考例6. プラスミドpIN5T4の作成 (第17図)

(1) プラスミドpIN4GIF54の作製

プラスミドpIN4GIF54は、第17図に示したように、①プラスミドpINIA2を制限酵素XbaIとPstIで消化して得られるリボプロテイン遺伝子のプロモーター領域 (図中1ppで示す) を含むDNA断片、②XbaIおよびEcoRIの粘着末端 (cohesive end) をもつオリゴヌクレオチド、③プラスミドpGIF54をEcoRIとPstIで消化して得られるhIFN- γ 遺伝子を含むDNA断片の3つの断片から以下のようにして造成した。尚、制限酵素類は、いずれも宝酒造社製のものをを用いた。

A. pINI-A2のXbaI-PstI DNA断片の調製

pINI-A2 DNA 3 μ gを1 \times TA溶液 (33mM トリス酢酸緩衝液、pH7.6、66mM 酢酸カリウム、10mM 酢酸マグネシウムおよび0.5mM ジチオスレイトール) 150 μ l中でXbaI及びPstI各々15単位を加え37 $^{\circ}$ C60分間反応させ、DNAを切断した。次に、1.0%寒天ゲル電気泳動を行った後、約980b.



固相法で合成した。合成法の詳細は特願昭57-86180Iに開示している。

上記オリゴヌクレオチド100pmolを30 μ l中のキナーゼ反応溶液 (50mM トリス塩酸緩衝液、pH8.0、10mM MgCl₂、10mM ジチオスレイトール) 中で2単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) を加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間で5'-OHをリン酸化した。

D. pIN4GIF54の造成

pIN4GIF54プラスミドの造成は、上記の如く調製した3種のDNA断片を以下のようにしてライゲーションすることにより行った。pINIA2のXbaI-PstI DNA断片5 μ l (エタノール沈澱を10 μ lの蒸留水に溶解したもの)、pGIF54のEcoRI-PstI DNA断片5 μ l (エタノール沈澱を10 μ lの蒸留水に溶解したもの) 及び、リン酸化したオリゴヌクレオチドの3 μ l (10pmol) に10倍濃度のライゲーション反応液 (20mM トリス塩酸緩衝液、pH7.6、10mM MgCl₂) 2 μ l、4mM ATP 2 μ l及びT4 DNAリガーゼ

p.に相当する位置のゲルを切り出し、透析チューブに入れ電気泳動することによりXbaI-PstI DNA断片を溶出した。溶出液に等量のフェノールを加えエチジウムブロマイドを抽出除去した後、2.5倍量のエタノールを加え、-80 $^{\circ}$ C30分間放置し、10,000rpm 10分間遠心を行い、DNA断片をエタノール沈澱物として得た。このエタノール沈澱物に10 μ lの蒸留水を加え、DNA断片を溶解した。

B. pGIF54のEcoRI-PstI DNA断片の調製

プラスミドpGIF54は、特願昭57-86180号明細書に記載されているプラスミドpGIF4と本質的に同一のプラスミドであり、該プラスミドにより形質転換された大腸菌WA802/pGIF4 はSBMC105と命名され、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研条寄第282号 (FEMM BP-282) として寄託されている。

pGIF54 DNA 3 μ gを1 \times TA溶液30 μ l中でEcoRI及びPstI 15単位を加え37 $^{\circ}$ C60分反応させDNAを切断した。次に0.7%寒天ゲル電気泳動を行い、前述の如く電気泳動を行うことによりゲルより約3.4kbのEcoRI-PstI DNA断片を溶出した。溶出液を前述の如くフェノール処理後、エタノール沈澱を行い、エタノール沈澱物に10 μ lの蒸留水を加えDNA断片を溶解した。

C. XbaI及びEcoRI粘着末端をもつオリゴヌクレオチドの調製

完全なhIFN- γ 蛋白を発現させる為、pINIA2のXbaI切断部位から下流にリボプロテインのシャイン-ダルガーノ (SD) 配列をもち、EcoRI粘着末端をもつオリゴヌクレオチド

(ベーリンガー・マンハイム社製) 1 μ l (5単位) を混ぜ、16 $^{\circ}$ C一夜反応を行った。

(2) 大腸菌WA802への形質転換

大腸菌WA802をL-broth 2.0mlで37 $^{\circ}$ C一夜培養後、その培養液0.3mlを30mlのL-brothに加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間振盪培養を行った。その後3000rpm 10分間遠心を行い、得られた菌体に50mM CaCl₂ 10mlを加え、菌体を懸濁し、さらに3000rpm 10分間遠心を行った。得られた菌体に1.0mlの50mM CaCl₂溶液を加え、氷中60分間放置した。このCa処理菌0.2mlに、実施例I-Dで得られたライゲーション反応液 (ライゲーションされた前記3種のDNA断片を含む) 10 μ lを加え、氷中60分間放置後、2mlのL-brothを加え、37 $^{\circ}$ C60分間培養を行った。培養液を40 μ l/mlのアンピシリンを含むNutrient寒天培地 (BBL社) にプレーティングし、37 $^{\circ}$ C一夜培養を行いアンピシリン耐性を示す形質転換株を選択した。次に得られた形質転換株についての1株からの常法 (cleared lysate法) に従いプラ

スミドDNAを分離後、挿入したXbaI-EcoRI領域周辺のDNA塩基配列をマキサム-ギルバート法(Methods. Enzymo 1., 65: 499~560, 1980)により決定し、当初の目的のDNA塩基配列を持つことを確認した。このプラスミドをpIN4GIF54と命名し、その形質転換大腸菌をWA802/pIN4GIF54と命名した。

pIN4GIF54のプロモーター周辺の塩基配列を第17図に示した。このpIN4GIF54ではシャイン-ダルガーノ (SD) 配列はpIN1A2と同一であり、又、SD配列からhIFN- γ の翻訳開始コドンATGまでの距離は9b.p.でありpIN1A2のそれと同じである。しかしSD配列と翻訳開始コドンATGの間にEcoRI切断部位を導入したことによりSD配列の変換、SD配列から翻訳開始コドン間の距離の変換が容易に行える為、hIFN- γ 遺伝子のみならず、他の遺伝子の高発現ベクターの造成に有利なベクターと考えられる。

(3) pIN5GIF54プラスミドの造成 (第17図参照)

A. XbaI及びEcoRI粘着末端をもつオリゴヌクレオチドの調製
AGGAGGTのSD配列をもち、5'末端にXbaI及びEcoRI粘着末端をもつオリゴヌクレオチド
5' CTAGGAGGTAG^{3'}

3' CTCATCTTAA^{5'} は前記した固相法 (特願昭57-86180 参照) で合成された。上記オリゴヌクレオチド100pmolを50 μ lのキナーゼ反応溶液 (実施例I-Cに記述) 中で2単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) を加え前述の如く37°C60分間で5' -OHをリン酸化した。

B. pIN4GIF54のXbaI-EcoRI DNA断片の調製

pIN4GIF54 2.5 μ gを1 \times TA溶液30 μ lでXbaI及びEcoRI各々5単位加え、37°C60分間反応させ、DNAを切断した。切断後0.7%寒天ゲル電気泳動を行い、ゲルより約4.3KbのXbaI-EcoRI DNA断片 (SD配列を含まない長い方の断片) を前記の如く電気泳動で溶出した。溶出液を前述の如くフェノール処理後、エタノール沈澱を行い、エタノール沈澱物に10 μ lの蒸留水を加え、DNA断片を溶解した。

C. pIN5GIF54の造成

pIN5GIF54のプラスミドの造成は、上記の2種のDNA断片を以下に示すようにライゲーションすることにより行った。pIN4GIF54のXbaI-EcoRI DNA断片5 μ l (エタノール沈澱を10 μ lの蒸留水に溶解したもの)、及びリン酸化したオリゴヌクレオチドの5 μ l (10pmol) に10倍濃度のライゲーション反応液 (前述) 3 μ l、100mM DTT、4mM ATP、蒸留水10 μ l及びT4 DNAリガーゼ (ペーリンガー・マンハイム社製) 1 μ l (5単位) を混ぜ16°C一夜反応を行った。

(4) 大腸菌WA802への形質転換

前述 (実施例II-A) の如く、L-brothで培養した大腸菌WA802の菌体をCaCl₂処理し、その菌体懸濁液0.2mlと実施例IV-Cで得られたライゲーション反応液とを混合するこ

とにより、大腸菌WA802の形質転換を行った。形質転換株の選択は、40 μ g/mlのアンピシリンを含むNutrient寒天培地で (BBL社) 行い、アンピシリン耐性を示す形質転換株を得た。得られた形質転換株の1株について、常法 (実施例II-A参照) に従いプラスミドを分離し、挿入したXbaI-EcoRI領域周辺のDNA塩基配列を解析した。pIN5GIF54には、図5に示したように、pIN4GIF54 (図3) にあったXbaI切断部位が消失しているはずである。そこで、分離した該プラスミドをXbaIと処理後、0.7%寒天ゲル電気泳動を行い、XbaIで切断されないプラスミドDNAについて挿入したオリゴヌクレオチド断片近傍のDNA配列をマキサム-ギルバート法で決定した。その結果、図5に示すように目的のDNA塩基配列をもつことが確認できた。このプラスミドをpIN5GIF54と命名し、それによって形質転換されたWA802株をWA802/pIN5GIF54と命名した。

(5) pIN5T4の作製 (第18図)

pIN5GIF54 5 μ gを20unitのAatII、20unitのSalIを用いて完全に分解後、T4 DNAポリメラーゼ及び4dNTP (dATP, dGTP, dCTP, TTPを含む)、を用いてAatII (3'末端を有する粘着末端) SalI (5'末端を有する粘着末端) によって生じた粘着末端を平滑末端とした (AatIIの場合は粘着末端を取りのぞくトリミング (trimming) を行い、SalIの場合は粘着末端を満たすフィルイン (fillin) を行った)。次に寒天電気泳動で分離しリポプロテインプロモーター (lpp^p) 及びGIF遺伝子を含む約750bpに相当するDNA断片を前述の方法により得た。一方pBR322 5 μ gを20unitのEcoRIを用いて完全に分解後、生じた粘着末端を前述の方法でfillinし平滑末端とした。次に20unitのAhaIIIを用いて完全に分解した後寒天電気泳動で分離し、DNA複製起点及びテトラサイクリン耐性遺伝子を含む約3.3Kdに相当するDNA断片を前述の方法により得た。両DNA断片を混合しライゲーションを行い前述の方法によりpIN5T4を得た。

実施例1. DTT還元による β gal210 α hANPAPI水解サンプルからの α hANP回収率の増加

A. API加水分解による β gal210 α hANPからの α hANPの回収

以下の実施例において、 β -ガラクトシダーゼ由来の210個のアミノ酸残基からなるポリペプチドと α -hANPとの融合蛋白質を β gal210 α hANPと略称する。

W3110/pGH α 210rop⁺ (参考例3) をテトラサイクリンを含む培地 (0.5%グリセリン、2.4%酵母エキス、1.2%トリプトン、100mMリン酸水素カリウム (pH7.5)) で、37°C14時間培養した。次に、遠心集菌後10mM Tris/HCl緩衝液 (pH9.3) に懸濁し、超音波処理で菌体を破碎後10000g、1分の遠心により沈澱を得た。沈澱は同緩衝液で洗浄後、5M尿素を含む同緩衝液に可溶化した。可溶化したサンプルの一部についてはSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行ない、融合蛋白の生産量

を調べた。残りはAPI (アクロモバクタープロテアーゼ I; 和光純薬工業株式会社製) による加水分解後、一部SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を行ない、水解が十分に行なわれていることを確認後、YMC-A-3020DSカラムを用いた逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により解析し、 α hANPの量を測定した。HPLCの結果から見積られる α hANPの量は、SDS-PAGEの結果予想される量の約1/4であり、 α hANPは、融合蛋白の相手である β gal210になんらかの形で保持され、遊離できないと考えられる。その原因として β -ガラクトシダーゼの210個のアミノ酸残基から成るポリペプチド (β gal210) にある3個のシステイン残基のいずれかと α hANPにある2個のシステイン残基のいずれかとの間にS-S結合生じ、 α hANPが遊離されないことが予想され、これらを確認するために以下の実験を行なった。

B. DTT還元による α hANPのAPI水解サンプルからの回収率の増加

S-S結合の関与を調べるために、 β gal210 α hANPのAPI水解後のサンプルをDTTで還元後、HPLCで α hANP量を測定した。その結果 α hANPの量は、DTTで還元する前に比べて約4倍に増加し (後記第1表)、実施例1のAでSDS-PAGEの結果から予想された量とほぼ一致した。以上の結果より、API水解後の β gal210 α hANPからの α hANPの回収率の低さは、 β gal210と α hANPの間にS-S結合が存在するためであると推定される。

実施例2. β gal210のシステイン残基のセリン残基への変換

API水解後の β gal210 α hANPからの α hANPの回収率の低さに β gal210と α hANPの間のS-S結合が関与していることを積極的に示すために、また β gal210を、 α hANPの

回収率がさらに良くなる融合蛋白の相手とするために β gal210のシステイン残基をすべてセリン残基に置換した。なお、 β -ガラクトシダーゼの210個のアミノ酸残基からなりその中のシステイン残基がすべてセリン残基に変えられているポリペプチドを β gal210 (Ser) と称し、これと α -hANPとの融合蛋白質を β gal210 (Ser) α hANPと称する。

A. プラスミドpGH α 210 (Ser) rop⁻の作製

β gal210にはN末端から76番目、122番目、154番目にシステイン残基が存在する。この3つのシステイン残基 (Cys) がセリン残基 (Ser) に変わった融合蛋白質をコードしており且つlacZ' 遺伝子をもつプラスミドpGH α 210 (Ser) rop⁻を作製した。このCys \rightarrow Serの変換に伴い、それぞれBglII, BamHI, AvaII制限酵素切断部位を生じるようにした。

3 μ g のpGH α 210rop⁻を、H緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH 8.0)、7mM MgCl₂、100mM NaCl] 50 μ l 中で20ユニットのPvuIと12ユニットのEcoRIにより完全消化した後、電気泳動的に1番大きいテトラサイクリン耐性遺伝子を含むDNA断片 (第1図中の①) を分離し、回収した。同様に3 μ g のpGH α 210rop⁻のDNAをH緩衝液50 μ l 中で20ユニットのAvaIと20ユニットのBamHIで完全消化したあと、電気泳動的に一番大きいlacZ' 210- α hANP遺伝子を含むDNA断片 (第1図中の②) を分離回収した。この両DNA断片①と②と、各々BamII, BamHI, AvaII切断部位を有し、システインをコードするコドンがセリンをコードするコドンに変わっている以下の塩基配列を有する5'末端がリン酸化された化学合成一本鎖DNA (第1図③④⑤に対応する) :

Bgl II

③ 5' pCTTGCTGGAGTCAGATCTTCCTGAG 3'

Bam HI

④ 5' pGAATCCGACGGGATCCTACTCGCTCAC 3'

Ava II

⑤ 5' pCATCTGTGGTCCAACGGGCG 3'

とを混合し、95℃で二重鎖DNAを変性させて一本鎖のDNAとした後、ゆっくり冷却してアニーリング (対合) させることにより二重鎖形成を行なった。この反応液にdNTPsとDNAポリメラーゼI (Klenow断片)、およびT4 DNAリガーゼとATPを加えて反応させることにより完全な環状二重鎖DNAとした。この反応液を用いて大腸菌W3110を形質転換し、テトラサイクリン耐性を示すクローンを得た。常法に従って解析し、BglII, BamHI及びAvaII部位が新たに挿入された目的のプラスミドpGH α 210 (Ser) rop⁻を得た。

B. API水解による β gal210 (Ser) α hANPからの α hANPの回収

前述のW3110/pGH α 210 (Ser) rop⁻株をテトラサイクリンを含む培地 (0.5%グリセリン、2.4%酵母エキス、1.2%トリプトン、100mMリン酸水素カリウム (pH7.5)) で、37℃14時間培養した。次に、遠心集菌後10mM Tris/HCl緩衝液 (pH9.3) に懸濁し、超音波処理で菌体を破碎後10000g、5分の遠心により沈澱を得た。沈澱は同緩衝液で洗浄後、5M尿素を含む同緩衝液に可溶化した。可溶化したサンプルの一部についてはSDS-PAGEを行ない、融

合蛋白の生産量を調べた。残りはAPI水解後、一部SDS-PAGEを行ない、水解が十分に行なわれていることを確認した後、HPLCを用いて解析し、 α hANPの量を測定した。HPLCの結果から見積られる α hANPの量は、SDS-PAGEの結果予想される量とほぼ一致し、また水解後のサンプルをDTT還元してもほとんど増加しなかった（第1表）。以上の結果は、API水解後の α hANPの回収率の低さが β gal210のシステイン残基に原因があることを示すものである。さらに β gal210 (Ser) はDTT還元及びその後の酸化の操作を経ることなく α hANPを効率よく回収できる α hANPとの融合蛋白であることがわかった。

第 1 表

融合蛋白質	α hANP量	
	-DTT	+DTT
β gal210 α hANP	6.7ng (0.25)	27.3ng (1.00)
β gal210(Ser) α hANP	24.2ng (0.97)	25.7ng (1.00)

β gal210 (Ser) α hANPは、 β gal210 α hANPと同様に①大腸菌で大量に産生され、②菌体破碎後の遠心で特異的に沈澱画分に移行するため融合蛋白質としての精製が容易であるという利点に加え、 β gal210 (Ser) にはシステイン残基がなく α hANPとのS-S結合が生じないため、 β gal210に比べAPI加水分解後の α hANPがDTT還元及びその後の酸化の操作なしに完全に回収できる利点を持つ。しかし、 α hANPを工業的に大量且つ簡便に製造するには、①尿素溶液への溶解度が小さいため、API水解容量が大きくなる。② β gal210 (Ser) α hANPのAPI水解の効率が若干悪いため、多量のAPIを必要とし、またAPI水解時間が長くなり、 α hANPの修飾が行なわれる可能性があるという問題点があった。そこで、次に β gal210 (Ser) α hANPを介しての α hANP製造における長所をもち、且つ前記問題点①②を解決するため、融合蛋白質を構成する相手ポリペプチドの探索の一つとして β -ガラクトシダーゼ領域をさらに短くしたW3110/pGH α Bal43により産生される β gal197 α hANPのN末端から76番目のシステイン残基をセリン残基に置換した β gal197 (Ser) α hANPの検討を行なった。ここで、 β -ガラクトシダーゼの97個のアミノ酸残基からなるペプチドを β gal197と称し、このペプチドと α -hANPとの融合ペプチドを β gal197 α hANPと称する。また、この β -ガラクトシダーゼ由来ペプチド中のシステイン残基がセリン残基に変わったものを β gal197 (Ser) と称し、これと α -hANPとの融合蛋白質を β gal197 (Ser) α hANPと称する。

実施例3. pGH α 97Sの作製

A: pGH α 97 (Ser) rop⁻の作製

β gal197 α hANPのN末端から76番目のアミノ酸であるシステインをセリンにかえた β gal197 (Ser) α hANPの遺伝

子を持つプラスミドpGH α 97 (Ser) rop⁻を作製した。

10 μ gのpGH α Bal43 (参考例5) をH緩衝液70 μ l中で50ユニットのPstI及び50ユニットのDdeIで完全消化した後、アガロースゲル電気泳動を行ない、283塩基対からなる α hANP遺伝子を含むDNA断片（第2図中の①）を分離、回収した。次に3 μ gのpGH α 210 (Ser) rop⁻（実施例1）を50 μ lのH緩衝液中、20ユニットのPvuI及び20ユニットのPstIで完全消化後電気泳動的に一番大きいテトラサイクリン耐性遺伝子を含むDNA断片（第2図中の②）を分離、回収した。さらに10 μ gのpGH α 210 (Ser) rop⁻をH緩衝液70 μ l中で50ユニットのPvuI及び50ユニットのDdeIで完全消化後、アガロースゲル電気泳動を行ない、101塩基対から成るlacZ' 遺伝子の一部を含むDNA断片（第2図中の③）を分離、回収した。これらの①②③のDNA断片をライゲーション後、この反応液で大腸菌W3110を形質転換し、テトラサイクリン耐性のクローンを得た。常法に従って解析し、制限酵素BglII切断部位が新たに挿入された、すなわち、N末端から76番目のアミノ酸システインがセリンに変わった融合蛋白質をコードするlacZ' 遺伝子を持つ目的のプラスミドpGH α 97 (Ser) rop⁻を得た。

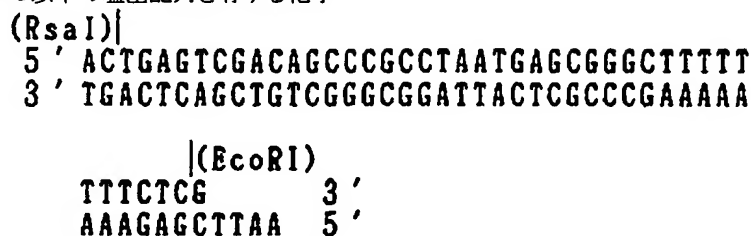
このプラスミドを含有する大腸菌Escherichiacoli SBM288は、微工研条寄第1253号 (FERM BP-1253) として、工業技術院微生物工業技術研究所にブタペスト条件に基き国際寄託されている。

B. pGH α 97Sの作製

W3110/pGH α 97 (Ser) rop⁻をテトラサイクリンを含む培地 (0.5%グリセリン、2.4%酵母エキス、1.2%トリプトン、100mMリン酸水素カリウムpH7.5) で37°C14時間培養した場合、 β gal197 (Ser) α hANPの産生は β gal197 α hANPに比べてかなり少なく、SDS-PAGEでわずかに対応するバンドが検出できる程度であった。そこで生産性を増加させることを目的として α hANPの構造遺伝子の直後にトリプトファンオペロンのアテニューエーターターミネーター（以後trp aと略す）を挿入したプラスミドpGH α 97 Sを作製した。

10 μ gのpGH α 97 (Ser) rop⁻をH緩衝液100 μ l中で50ユニットのBglII及び50ユニットのRsaIで完全消化した後、電気泳動により154塩基対 (bp) からなる、 β gal197 (Ser) のC末端及び α hANPのN末端をコードする遺伝子を含むDNA断片（第3図①）を分離、回収した。次に3 μ g pGH α 97 (Ser) rop⁻をS緩衝液 [150mM NaCl、7mM MgCl₂、10mM Tris-HCl (pH8.0)] 50 μ l中で20ユニットのBglII及び40ユニットのSalIで完全消化した後、電気泳動的に一番大きい複製開始点を含むDNA断片（第3図の②）を分離、回収した。さらに、3 μ gのpBR322をS緩衝液50 μ l中で10ユニットのEcoRI及び40ユニットのSalIで完全消化した後、電気泳動的に、小さい方のテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター領域を含むDNA断片（第3図の③）を分離、回収した。これらのD

NA断片①、②③と、それぞれの末端にRsaI平滑末端とEcoRI粘着末端を有し、かつ以下の塩基配列を有する化学



をライゲーションした後、この反応液で大腸菌W3110を形質転換し、テトラサイクリン耐性のクローンを得た。これらを常法に従って解析し、目的のクローンを得た。

C. β gal197 (Ser) α hANPの産生、

W3110/pGH α 97 (Ser) rop⁻及びW3110/pGH α 97Sをテトラサイクリンを含む培地 (0.5%グリセリン、2.4%酵母エキス、1.2%トリプトン、100mMリン酸水素カリウムpH7.5) で37℃14時間培養後、SDS-PAGEを行ない、 β gal197

(Ser) α hANPの生産性を比較した。その結果、 α hANP遺伝子の直後にtrp^aを挿入することにより β gal197 (Ser) α hANPの産生を著しく増加することができた (第4図)。W3110/pGH α 97Sを用いて産生した β gal197 (Ser) α hANPの量は、W3110/pGH α 210 (Ser) rop⁻を用いて産生した β gal210 (Ser) α hANPの量とほぼ等しく、 α hANPに換算するとき、培地当たり約2倍の生産性を示した。また、 β gal197 (Ser) α hANPも、 β gal210 α hANPや β gal210 (Ser) α hANPと同様、菌体破碎後の遠心で、大腸菌由来の蛋白質の少ない沈澱画分に移行した (第5図)。 β gal197 α hANPのAPI水解後のサンプルをDTTで還元するとき β gal210 α hANPの場合と同様に α hANPの量が増加するのに比べ、 β gal197 (Ser) α hANPのAPI水解後のサンプルは、 β gal210 (Ser) α hANPの場合と同様DTT還元により α hANPの量はあまり増えなかった (第2表)。さらに、 β gal197 (Ser) α hANPは、 β gal210 (Ser) α hANPと比べて5M尿素溶液への溶解度が約10倍 (α hANP換算約21倍) 大きくAPI水解の感受性は、約100倍 (α hANP換算約200倍) 高かった。

第 2 表

融合蛋白質	α hANP量	
	-DTT	+DTT
β gal197 α hANP	7.8mg (0.31)	25.0mg (1.00)
β gal197(Ser) α hANP	24.8mg (0.80)	30.9mg (1.00)

合成DNA断片 (trp^a) (第3図中の④) :

実施例4. β gal197 (Ser) α hANPのAPI水解高感受性の原因追求

β gal197 (Ser) α hANP中の β gal197 (Ser) と α hANPとはGln-Phe-Lysで結合しており、API水解によりLysのC末端側のペプチド結合が切られる。一方 β gal210 (Ser) α hANPの場合はGlu-Phe-Lysで結合している。 β gal197 (Ser) α hANPが β gal210 (Ser) α hANPに比べ、API水解を受けやすいのは、フェニルアラニンのN末端側におけるGlu→Glnの変化に伴い σ 位のカルボキシル基がカルボキシアミドに変わってマイナスの電荷がなくなり、リジンのプラス電荷との干渉がなくなったためであると仮定して、 β gal197 (Ser) と α hANPとの結合部位をGlu-Phe-Lysに換えた β gal197 (Ser) α hANPの遺伝子をもつpGH α 97SEを作製し、検討した。

A. pGH α 97SEの作製

3 μ gのpGH α 97S (実施例3) をH緩衝液50 μ l中で20ユニットのBamHIと20ユニットのAvaIにより完全消化した後、電気泳動的に1番大きい α hANP遺伝子を含むDNA断片 (第6図中の①) を分離、回収した。同様に3 μ gのpGH α 97SをH緩衝液50 μ l中で20ユニットのBglII及び20ユニットのEcoRIで完全に消化した後、電気泳動的に一番大きいテトラサイクリン耐性遺伝子を含むDNA断片 (第6図中の②) を分離、回収した。この両DNA断片①②と、EcoRI切断部位を有し、グルタミンをコードするコドンがグルタミン酸をコードするコドンに変わった以下の塩基配列を有する5'末端がリン酸化された化学合成一本鎖DNA (第6図中の③)。



とを混合し、95℃で二重鎖DNAを変性させて一本鎖DNAとした後、ゆっくり冷却し、アニーリング (対合) させる

ことにより、二重鎖形成を行なった。この反応液にdNTPsとDNAポリメラーゼI (Klenow断片)、およびT4DNAリ

ガーゼとATPを加えて反応させることにより完全な二重鎖DNAを形成させた。この反応液を用いて大腸菌W3110を形質転換し、テトラサイクリン耐性を示すクローンを得た。常法に従って解析し、新たにEcoRI切断部位が挿入された、すなわち β gal α 97 (Ser) と α hANPの連結部位のアミノ酸がGlnPhe LysからGlu Phe Lysに変わった β gal α 97 (Ser) α hANPの遺伝子を持つプラスミド β gal α 97SEを得た。

B. β gal97 α (Ser) hANPと β gal97 (Ser) E α hANPのAPI効率の比較

W3110/pGH α 97S及びW3110/pGH α 97SEをテトラサイクリンを含む培地 (0.5%グリセリン、2.4%酵母エキス、1.2%トリプトン、100mMリン酸水素カリウム (pH7.5)) で、37℃14時間培養した。次に、遠心集菌後10mM Tris/HCl緩衝液 (pH9.3) に懸濁し、超音波処理で菌体を破碎後10000g、1分の遠心により沈澱を得た。沈澱は同緩衝液で洗浄後、5M尿素を含む同緩衝液に可溶化した。可溶化したサンプルは、4つに分けそれぞれ0.1, 5, 25ng/5 μ g α hANPのAPIを加え、30℃45分処理後、調整し、SDS-PAGEを行なった。その結果、 β gal97 (Ser) と α hANPの結合部位がGln-Phe-LysでもGlu-Phe-LysでもAPI水解の効率は変わらなかった (第7図)。

以上の結果より β gal97 (Ser) α hANPのAPI水解が β gal210 (Ser) α hANPのそれに比べて効率的であるのは、局所的な電荷の干渉のためではないと結論できた。 β gal97 (Ser) α hANP自身の構造によりリジン残基がAPIによりアタックされやすいと思われる。

実施例5. pPlacZ' 97 (Ser) α hANPの作製

pGH α 97Sのlacプロモーターをスファージ由来のPlプロモーターに変換したpPlacZ' 97 (Ser) α hANPを作製した。

10 μ gのpPlacZ' 210 α hANP (参考例4) を100 μ lのH緩衝液中で50ユニットのEcoRI及び50ユニットのPvuIで完全消化後、5%アクリルアミドゲル電気泳動を行ない143塩基対からなる β ガラクトシダーゼのN末端をコードするlacZ' 遺伝子を含むDNA断片 (第8図中の①) を分離、精製した。同様に3 μ gのpPlacZ' 210 α hANPを50 μ lのH緩衝液中の20ユニットのEcoRIと20ユニットでAvaIで完全に消化した後、電気泳動的に一番大きいPlプロモーター及びアンピシリン耐性遺伝子を含むDNA断片 (第8図中の②) を分離、精製した。この2つのDNA断片①及び②、並びに3 μ gのpGH α 97SをH緩衝液50 μ l中で10ユニットのPvuIと10ユニットのAvaIで完全消化した後のDNA断片③をライゲーションした後、この反応液で大腸菌W3110/Ci (Ci857遺伝子及びカナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドを保持するW3110株) を形質転換し、テトラサイクリン、アンピシリン及びカナマイシン耐性のクローンを得た。これらを常法に従って解析し、目的のクローンを得た。

実施例6. pINlacZ' 97 (Ser) α hANPの作製

プラスミドpPlacZ' 97 (Ser) α hANPのPlプロモーターを大腸菌外膜タンパクリポプロテインのlppプロモーターに変換したプラスミドpINlacZ' 97 (Ser) α hANPを作製した。

10 μ gのpPlacZ' 97 (Ser) α hANPをH緩衝液100 μ l中で50ユニットのBamHIで完全消化後、5ユニットのEcoRIで部分消化し、1%アガロースゲル電気泳動を行ない、809塩基対からなる β gal97 (Ser) - α hANP構造遺伝子及びテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター領域を含むEcoRI-BamHI DNA断片 (第9図中の①) を、分離、精製した。次に3 μ gのプラスミドpIN5T4 (特開昭S61-132186及び参考例6) をH緩衝液50 μ l中で20ユニットのEcoRI及び20ユニットのBamHIで完全消化後、電気泳動的に一番大きいlppプロモーターを含むDNA断片 (第9図中の②) を分離精製した。これらの2つのDNA断片①、②をライゲーションした後、大腸菌W3110に形質転換し、テトラサイクリン耐性のクローンを得た。常法に従って解析し目的のクローンを得た。

実施例7. α hANPの精製

実施例3で作製したW3110/pGH α 97S株をテトラサイクリンを含む培地 (0.4%酵母エキス、0.4%KH₂PO₄、0.4%K₂HPO₄、0.3%Na₂HPO₄、0.02%NH₄Cl、0.12%(NH₄)₂SO₄、0.1%Mg₂SO₄・7H₂O、1.5%グルコース、pH7.0、2%グリセリン4回添加) で37℃18時間、30l容量 (実容量20l) のジャーファーメンターを用いて培養した。次に培養液を高圧ホモジナイザー (Manton Gaulin Laboratory Homogenizer 15M-8TA) を用い、8000psiで破碎した後、遠心分離により沈澱画分を得た。沈澱画分を10mM Tris-HCl (pH9.3) で洗浄した後、8M尿素溶液で可溶化し、さらに27mM Tris-HCl (pH9.3) を加え、5M尿素溶液とした。これを、40AUのAPI (和光純薬工業株式会社製) を30℃、60分間処理したのち、カートリッジフィルター (日本ミリポアリミテッドCWSC) でろ過し、次に、Zeta prep QAE (日本ミリポアリミテッド) 社製を用いるカラムクロマトグラフィーにかけた。このとき、融合蛋白の相手である β gal97 (Ser) はQAEに吸着し除かれる。素通り画分に酢酸を加えてpH5.0としたのち、10mMギ酸アンモニウム (pH5.0) 5M尿素で平衡化したCMトヨパール650Mを用いるカラムクロマトグラフィーにかけた。 α hANPは、225mM及び400mMのNaClで段階的に溶出した。 α hANP画分に酢酸を加え、SPW-C-ODS (ケムコ社) カラムを用いたMPLC (山村化学) で脱塩後、C₁₈-HPLCにかけ、 α hANP標品を得た。

最終的に得られた α hANP標品は、YMC-A-3020DSカラムを用いた逆相高速液体クロマトグラフィー (Waters社製) の結果、一本のピークであった (第10図)。また、自動アミノ酸分析器 (日立製作所製835-50) による、アミノ酸分析の結果得られた α hANP標品のアミノ酸組成は α hANPのアミノ酸配列から予想される値と一致し、さらに、気相プロテインシーケンサーModel 470A (Applied Bi

osystem社製)により得られた標品のアミノ酸配列は、 α hANPのそれに完全に一致した。

さらに、この α hANP標品は、①SD系ラットにおける利尿・降圧活性、②ヒヨコの直腸弛緩活性、③ラジオイムノアッセイによる免疫交叉活性に関して化学的に合成した α hANP標品(ペプチド研製)と等価であった。

本発明における方法を用いれば、1の培養液から約5gの融合蛋白(α hANP約1gに相当)が得られ、精製効率約50%で純粋な α hANPを得ることができる。この様な高生産性及び精製効率は、本発明の製造法が如何に秀れているかを物語っており、工業的に極めて有用である。

尚、実施例5で作製したpPlacZ' 97 (Ser) α hANPで形質転換したW3110/C1/pPlacZ' 97 (Ser) α hANPおよび実施例6で作製したpINlacZ' 97 (Ser) α hANPで形質転換したW3110/pINlacZ' 97 (Ser) α hANPを用いても菌体蛋白の約30%に当たる β gal97 (Ser) α hANPを、沈澱(不溶)画分から得ることができる。

実施例8.pG97SHPCTの作製

A.pG97S18の作製

5 μ gのプラスミドpGH α 97SEを100 μ lのS緩衝液中で12ユニットのEcoRIと80ユニットのSalIで完全消化した後アガロースゲル電気泳動により一番大きいDNA断片①を分離、精製した。次に5 μ gのプラスミドpGH α 97SEを100 μ lのS緩衝液中で80ユニットのSalIで完全消化した後アガロースゲル電気泳動により2番目に大きいテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター領域を含むDNA断片②を分離、精製した。次に1 μ gのプラスミドpUC18(宝酒造より購入)を100 μ lのS緩衝液中で12ユニットのEcoRIと80ユニットのSalIで完全消化した後、フェノール処理で酵素を失活、エタノール沈澱によりフェノール及び塩を除いた③。先に精製したDNA断片①、②とpUC18をEcoRIとSalIで消化したもの③を混合してライゲーションした後、この溶液で大腸菌W3110株を形質転換、テトラサイクリン耐性のクローンを得た。常法に従って解析し、pGH α 97SEの α hANP遺伝子をコードするEcoRI-SalI DNA断片が以下に示すpUC18のポリリンカー部位のEcoRI-SalI DNA断片、

EcoRIBamHI

5' GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGA

3' CTTAAGCTCGAGCCATGGGCCCCTAGGAGATCT

SalI

-GTCGAC 3'

-CAGCTG 5'

に置換されたプラスミドpG97S18を得た。

B.pG97SHPCTの作製

5 μ gのプラスミドpG97S18を50 μ lのH緩衝液中で12ユニットのEcoRIと12ユニットBamHIで完全消化した後、アガロースゲル電気泳動により一番大きなDNA断片④を分離、精製した。次に5 μ gのプラスミドpGH97S18を50のH緩衝液中で12ユニットのBamHIで完全消化後、テトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター領域を含むDNA断片⑤をアガロースゲル電気泳動により分離、精製し

た。次に10 μ gのプラスミドpAHPCT38をM緩衝液中で12ユニットのBamHIと24ユニットのKpnIで完全消化した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、ヒトカルシトニンのN末端から7番目のTyrから32番目のPro及びこれに続くGlyLysLysArgをコードする、81bpからなるKpnI-BamHI DNA断片⑥を分離、精製した。このDNA断片④、⑤及び⑥と、各々の末端にEcoRI粘着部位とKpnI粘着部位を有し、かつ以下のDNA塩基配列を有する5'末端をリン酸化された合成DNA断片⑦、

EcoRI

5' pAATTCCTCGAGTGTGGTAACCTGAGCACCTGT

3' GGAGCTCACACCATTGGACTCGTGGACA

KpnI

-ATGCTGGGTAC 3'

-TACGACCP 5'

を混合してライゲーションした後、この溶液で大腸菌W3110株を形質転換、テトラサイクリン耐性のクローンを

得た。常法に従って解析し、目的のプラスミドpG97SHPCTを得た(第19図参照)。

なお、プラスミドpAHPCT38については、特開昭58-203953に記載され、pAHPCT38を持つ大腸菌(E15/pAHPCT38)S BNC138は工業技術院微生物工業研究所に微工研菌寄第6523号(FERM P-6523)として寄託され、微工研条寄第283号(FERM BP-283)としてブダペスト条約に基く国際寄託に移管された。

実施例9. ヒトカルシトニン前駆体の精製

前述のpG97SHPCTによって形質転換された大腸菌W3110/pG97SHPCT株をテトラサイクリンを含む培地(0.5%グリセロール、2.4%酵母エキス、1.2%トリプトン、100mMリン酸カリウム(pH7.5))で37℃、16時間培養した。次に、培養液を遠心して得た菌を10mMトリス塩酸(pH7.8)に懸濁後、フレンチプレス細胞破砕機(SLM-AMINCO社製)を用い8000psiで破砕、10000g、10分の遠心を行った。この上清画分と沈澱画分についてSDS-PAGEを行ったところβgal97SHPCTは、βgal97(Ser)αhANPと同程度に生産され、同様に特異的に沈澱画分に回収されることがわかった。この沈澱画分を8M尿素水溶液に懸濁した後、3容量の67mMトリス塩酸(pH7.8)を加え、2M尿素水溶液とした。これに基質の1/2000(W/W)量のV8プロテアーゼ(Boehringer Mannheim社より購入)を加え、37℃、10分間処理した。一部をとりYMC-A-0020DSをつけた逆相高速液体クロマトグラフィ(島津製作所)で解析したところβgal97SHPCTに存在する全部で10個のグルタミン酸のうちβgal97SとHPCTの間のグルタミン酸が最も切断されやすく、特異的にHPCTが切りだされ、その回収率は約70%であった(第20図)。さらに、この溶液を2M尿素を含む50mMトリス塩酸(pH7.8)で平衡化したZeta-Prep QAE クロストを行い、素通り画分に約95%純度のHPCTをほぼ100%の回収率で得ることができた。

このことは、βgal97SがαhANPのみならず、ヒトカルシトニン前駆体(HPCT)生産のための付加ペプチドとして秀れていることを示している。

【図面の簡単な説明】

第1図は、βgal210のシステイン残基をセリン残基にかえたβgal210(Ser)とαhANPの融合蛋白の発現プラスミドpGHα210(Ser)rop⁻の作製プロセスの概略を示す。図中■は、αhANPをコードするDNA領域を示す。

第2図は、βgal97(Cys)のシステイン残基をセリン残基にかえたβgal97(Ser)とαhANPの融合蛋白発現プラスミドpGHα97(Ser)rop⁻の作製プロセスの概略を示す。

第3図はpGHα97(Ser)rop⁻のαhANP遺伝子の直後に3'-非翻訳領域を欠失させトリプトファンオペロンのアテニューエーターミネーター(trp a)を挿入した

βgal97(Ser)αhANPの発現プラスミドpGHα97Sの作製のプロセスの概略を示す。

第4図は、αhANP遺伝子の3'非翻訳領域の欠失び直後へのtrp a挿入による融合蛋白の産生能への効果を示すSDS-PAGEである。

第5図は、W3110/pGHα97Sの培養菌体処理物についてのSDS-PAGEを示す。図中、Tは破砕培養菌体全体、Sは遠心後の上清画分、Pは沈澱画分を示す。

第6図は、融合蛋白質中のβgal97(Ser)とαhANPの結合部をGlu-Phe-Lysに変換したβgal97(Ser)αhANP発現プラスミドpGHα97SE作製のプロセスの概略を示す。

第7図は、融合蛋白質中のβgal97(Ser)とαhANPの連結部の違いによるAPI水解の効率の差を示すSDS-PAGEである。

第8図は、融合蛋白がλファージのPlプロモーター支配下に発現されるプラスミドpPlacZ' 97(Ser)αhANPの作製のプロセスの概略を示す。

第9図は融合蛋白が大腸菌のlppプロモーター支配下に発現されるプラスミドpINlacZ' 97(Ser)αhANP作製のプロセスの概略を示す。

第10図は、βgal97(Ser)αhANPから精製したαhANPの逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の結果を示す。

第11図は、βgalαhANP融合蛋白発現プラスミドの1つpGHα1007の作製プロセスの概略を示す。図中■部はαhANPをコードするDNA領域を示す。

第12図は、β-ガラクトシダーゼ(β-gal)が縮小化された3種のβgalαhANP融合蛋白発現プラスミドの作製プロセスの概略を示す。

第13図は、pGHα210rop⁻の作製プロセスの概略を示す。

第14図は、pGHα210EcoRIの作製プロセスの概略を示す。

第15図は、融合蛋白がλファージのPlプロモーター支配下に発現されるプラスミドpplacZ' 210αhANPの作製プロセスの概略を示す。

第16図は、βgal領域を縮小したプラスミドpGHαBalの作製プロセスの概略を示す。

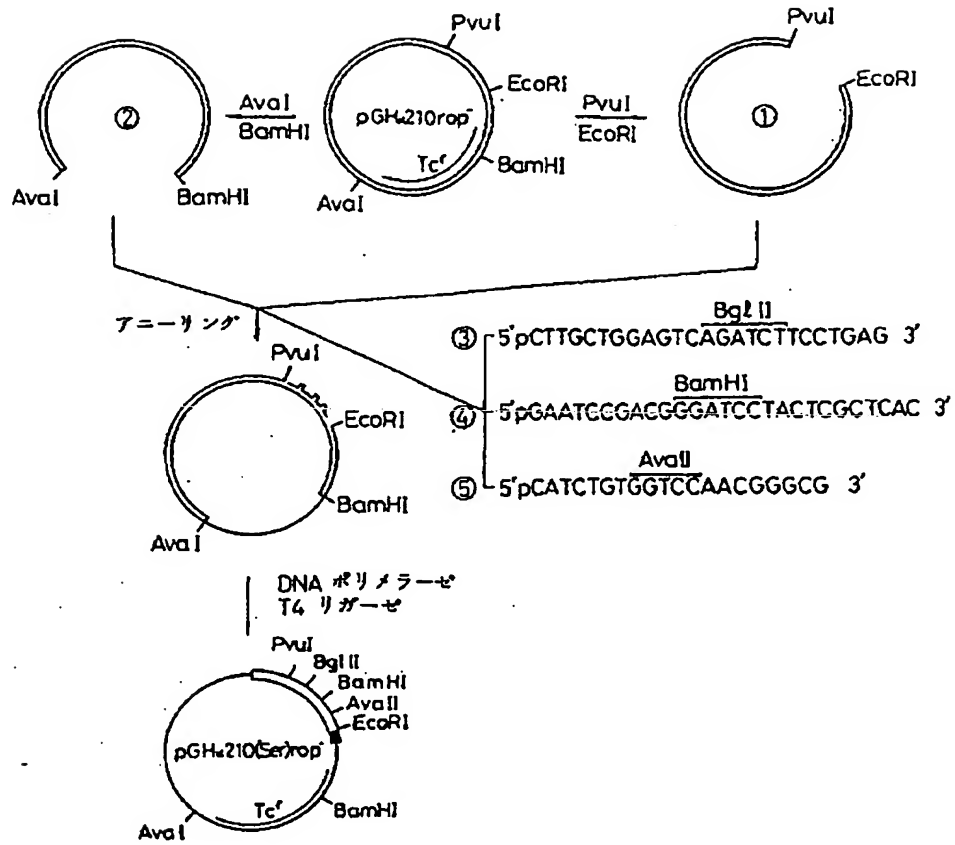
第17図は、プラスミドpIN5GIF54の作製プロセスの概略図を示す。

第18図は、プラスミドpIN5T4の作製プロセスの概略図を示す。

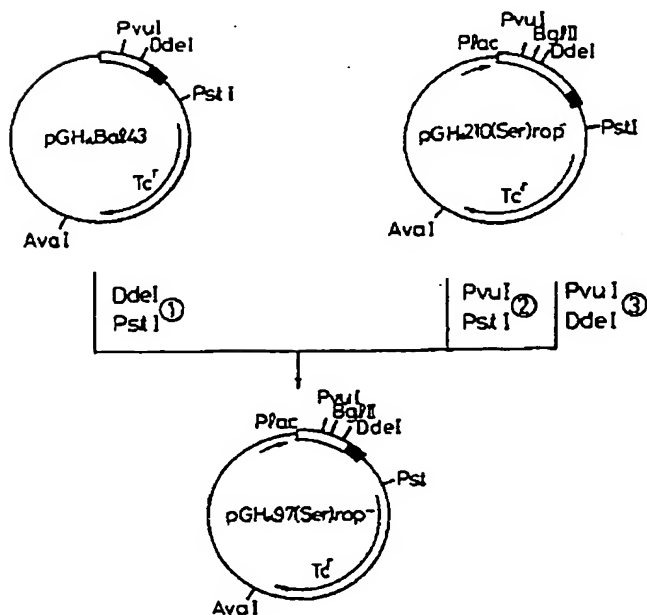
第19図は、プラスミドpG97SHPCTの作製プロセスの概略図を示す。

第20図は、βgal97SHPCTから精製したHPCTの逆相HPLCの結果を示す。

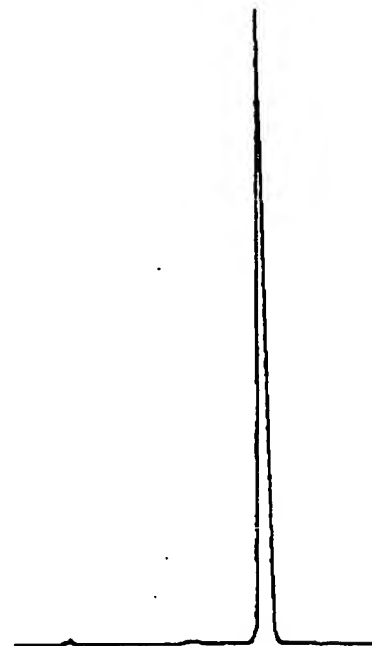
【第1図】



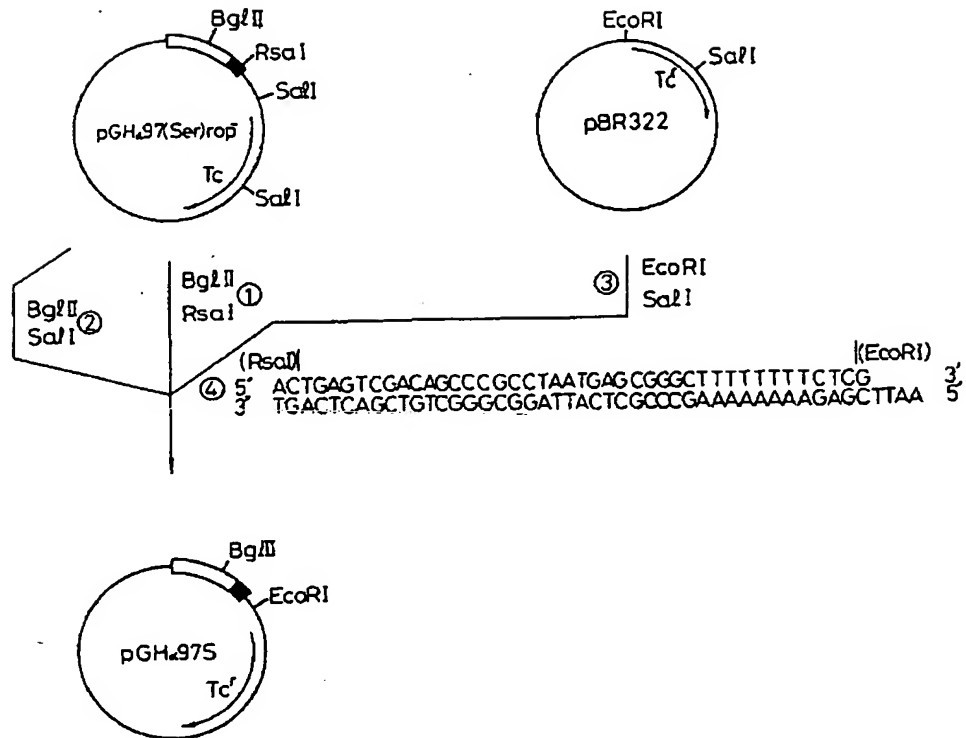
【第2図】



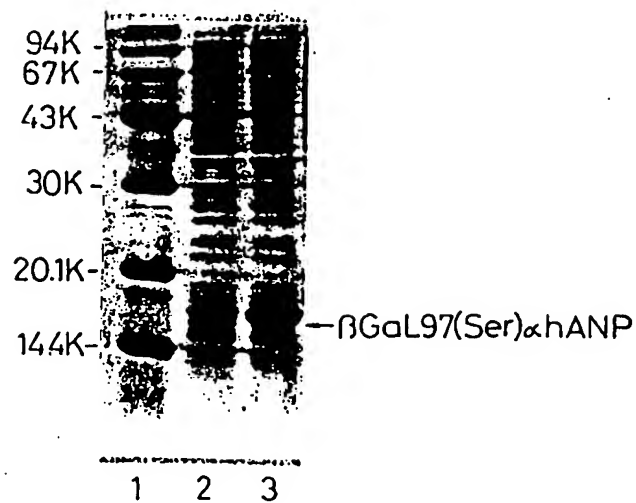
【第10図】



【第3図】



【第4図】



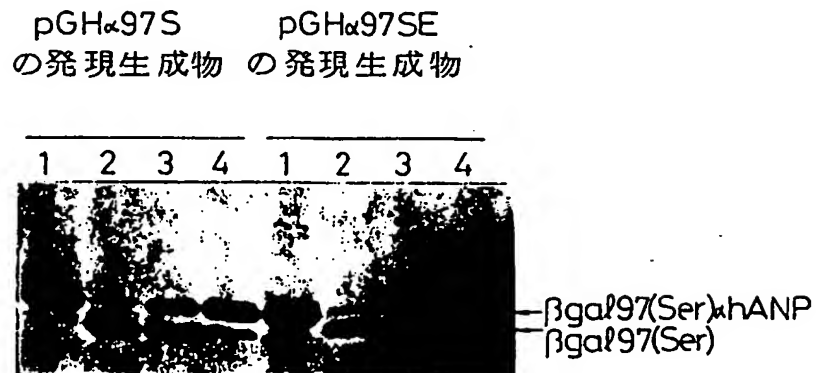
- レーン1 分子量マーカー
 レーン2 ...pGHΔ97(Ser)rop⁻ による発現生成物
 レーン3 ...pGHΔ97S による発現生成物

【第5図】



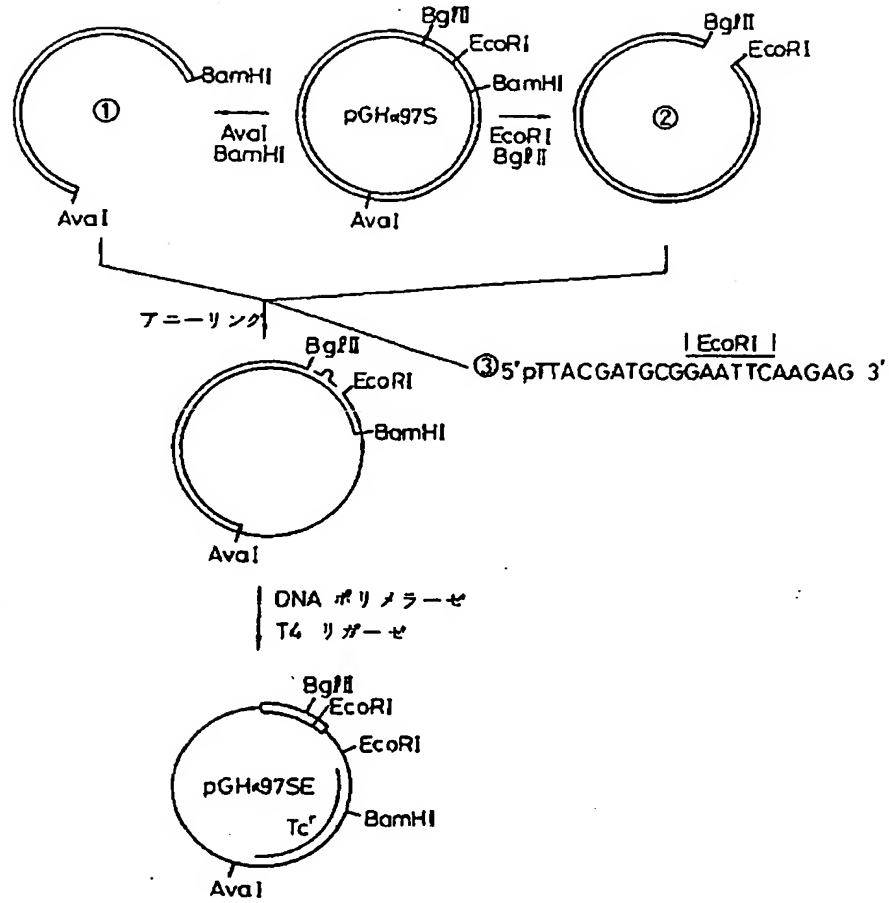
M ... 分子量マーカー
 T ... 培養菌体破砕物中の発現生成物
 S ... 上清中の発現生成物
 P ... 沈澱物中の発現生成物

【第7図】

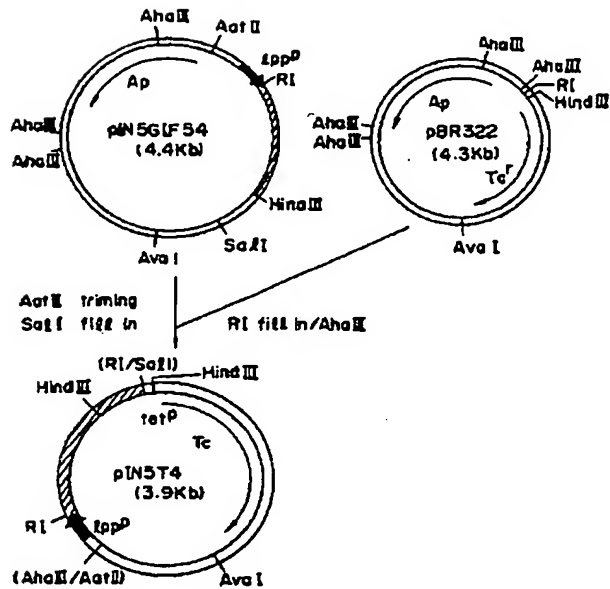


レーン	API 酵素使用量	
1	0 ng API / μg	αhANP
2	5 ng API / μg	αhANP
3	1 ng API / μg	αhANP
4	0.2 ng API / μg	αhANP

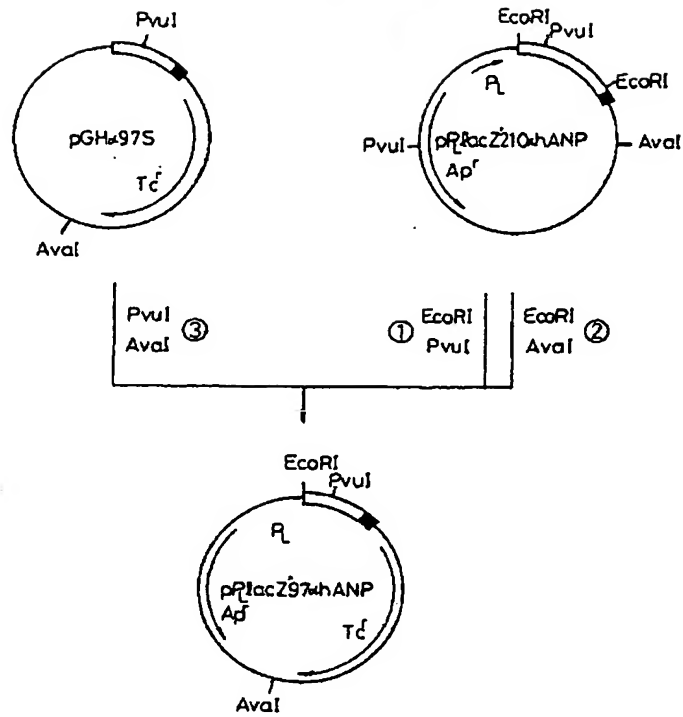
【第6図】



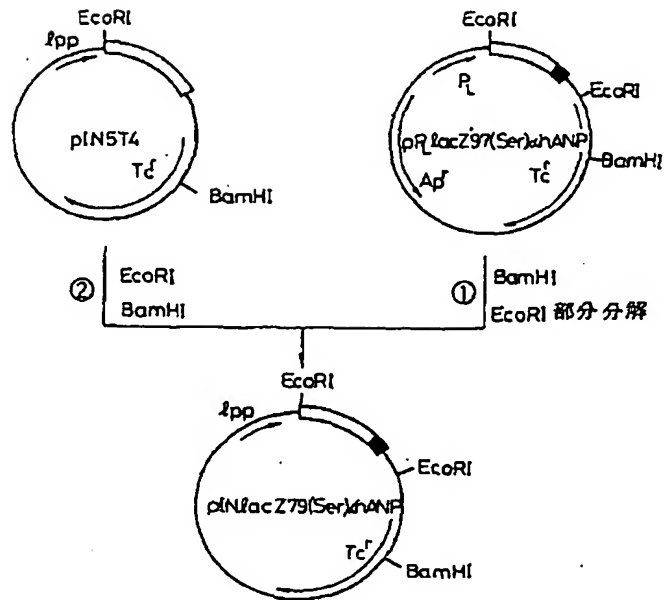
【第18図】



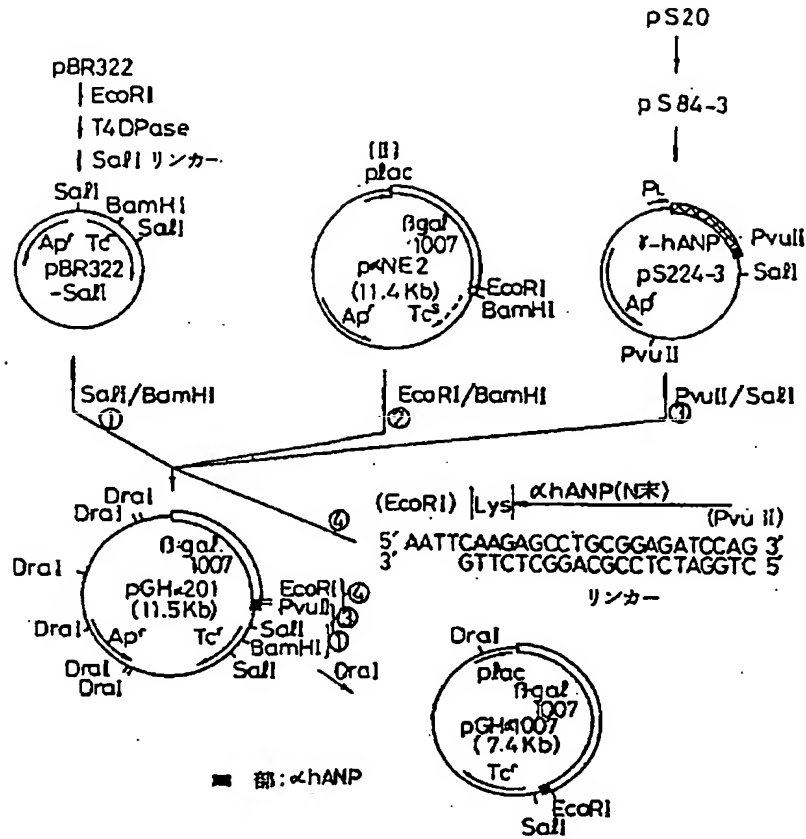
【第 8 図】



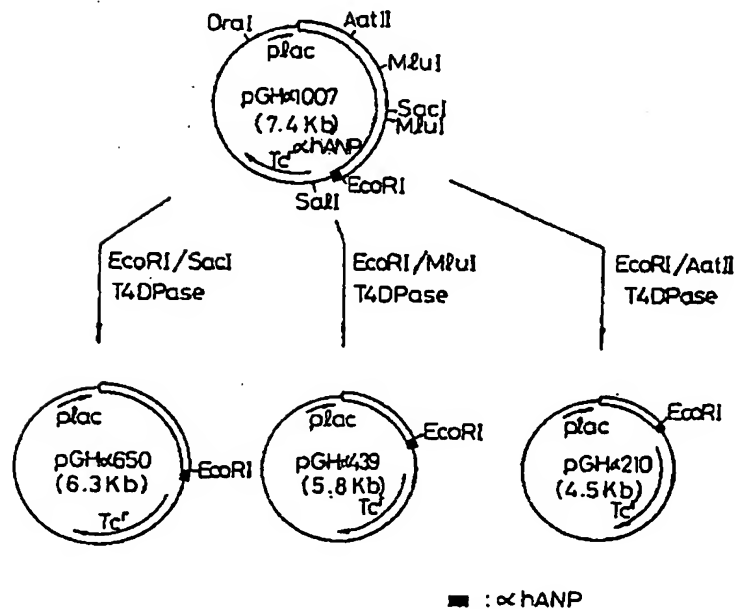
【第 9 図】



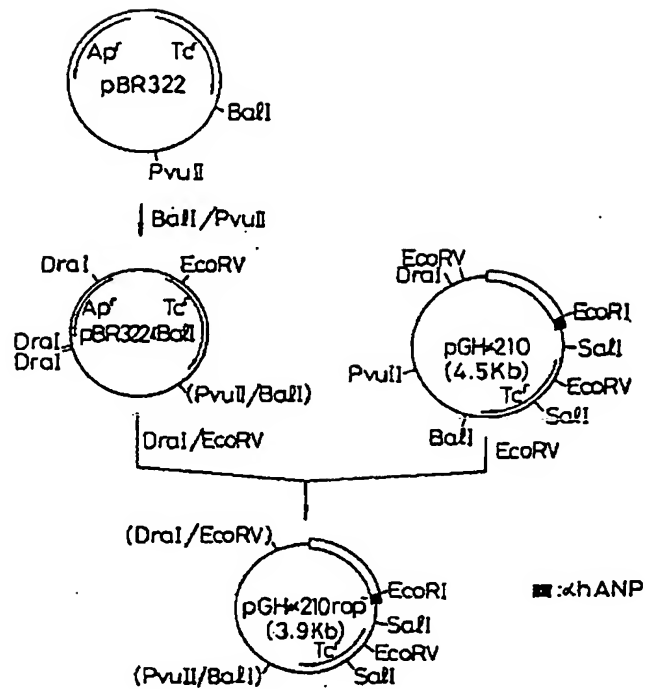
【第11図】



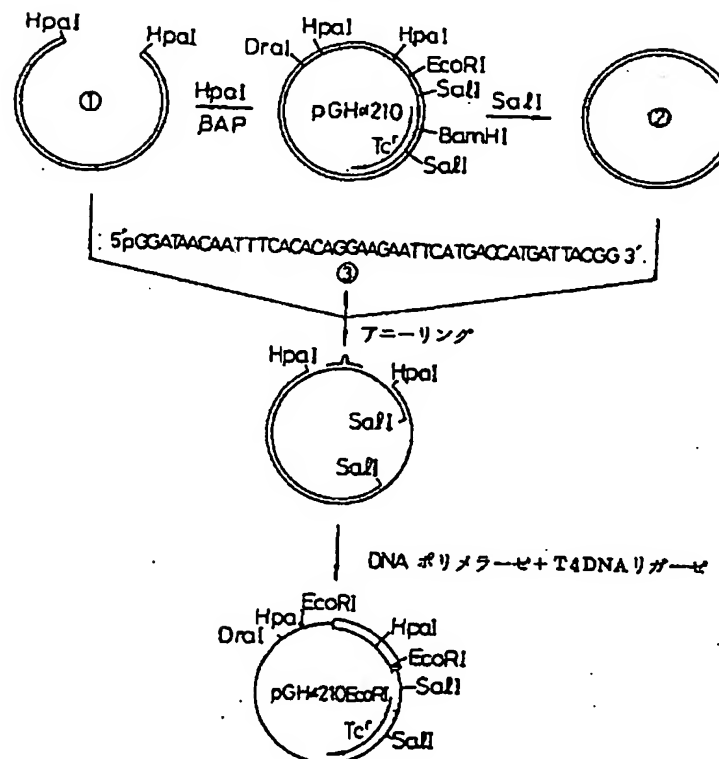
【第12図】



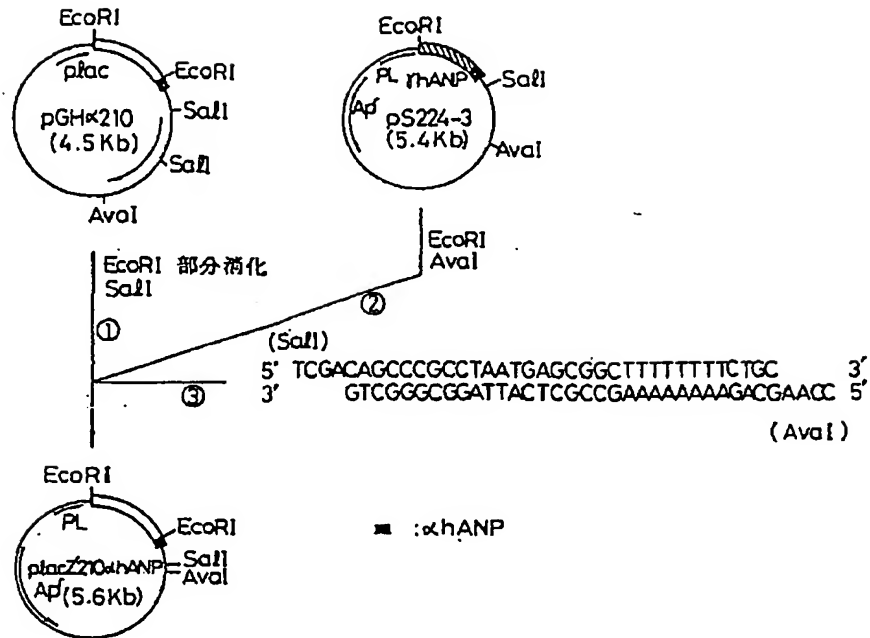
【第13図】



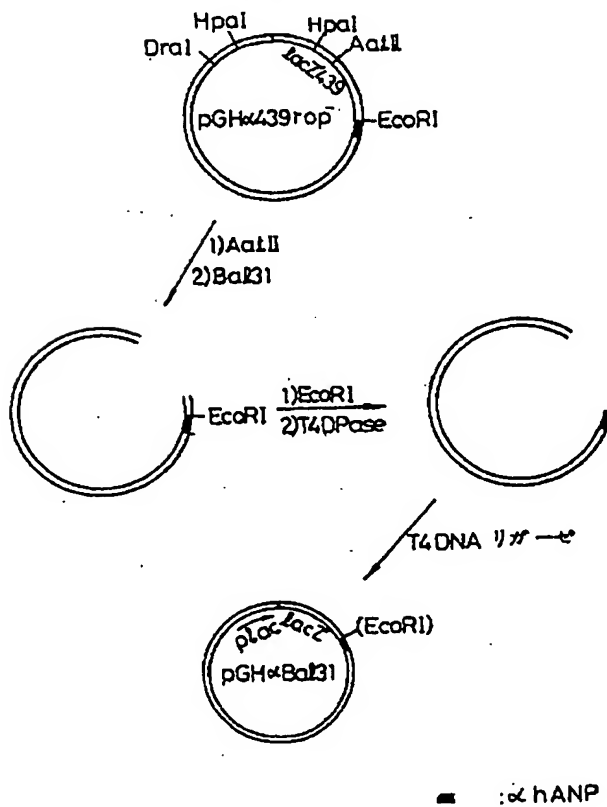
【第14図】



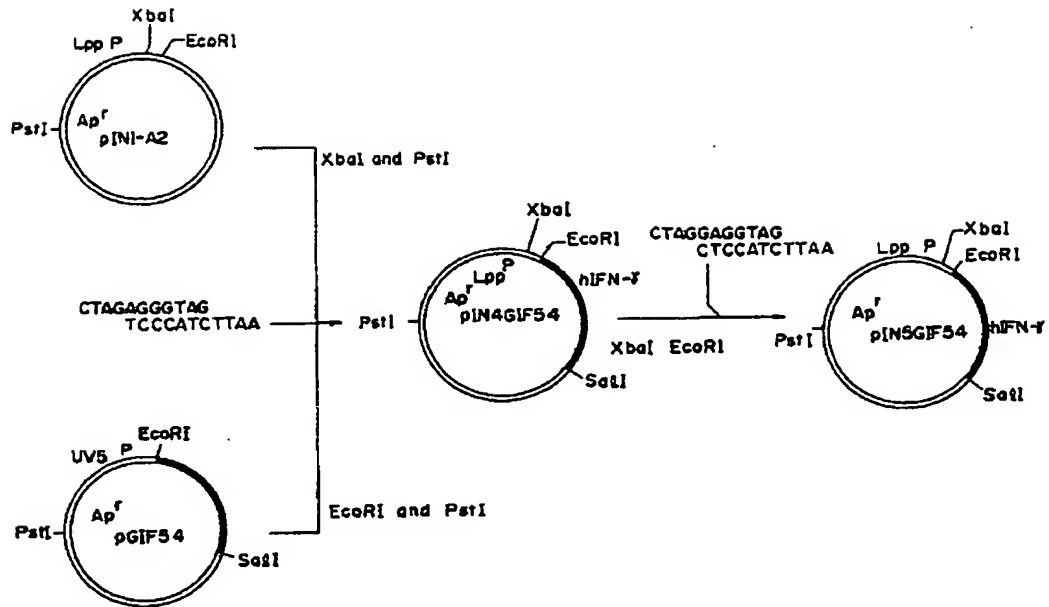
【第15図】



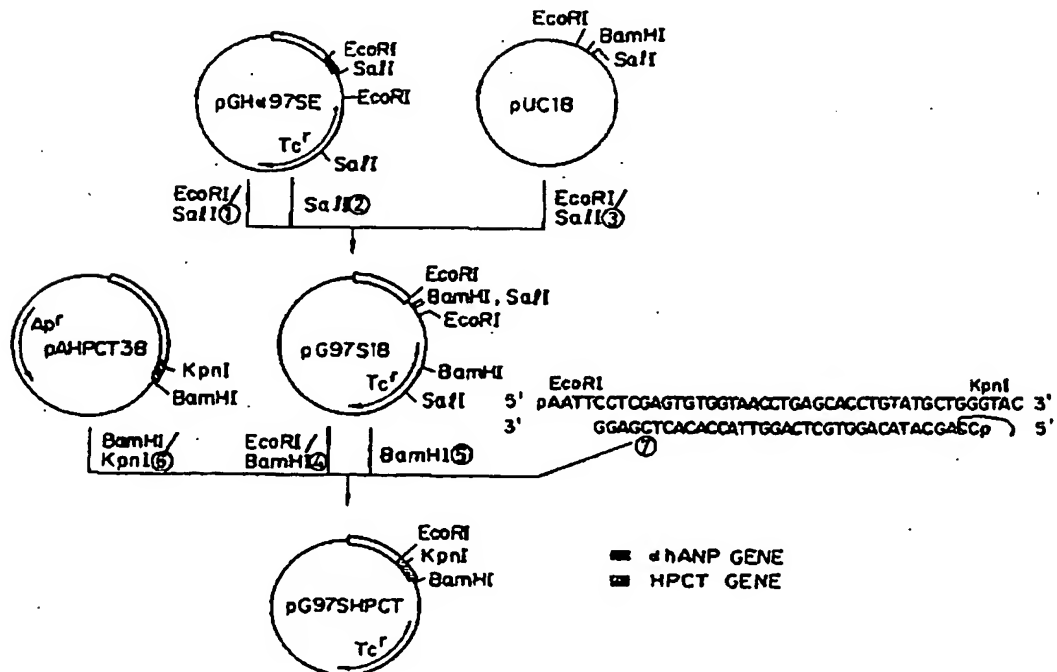
【第16図】



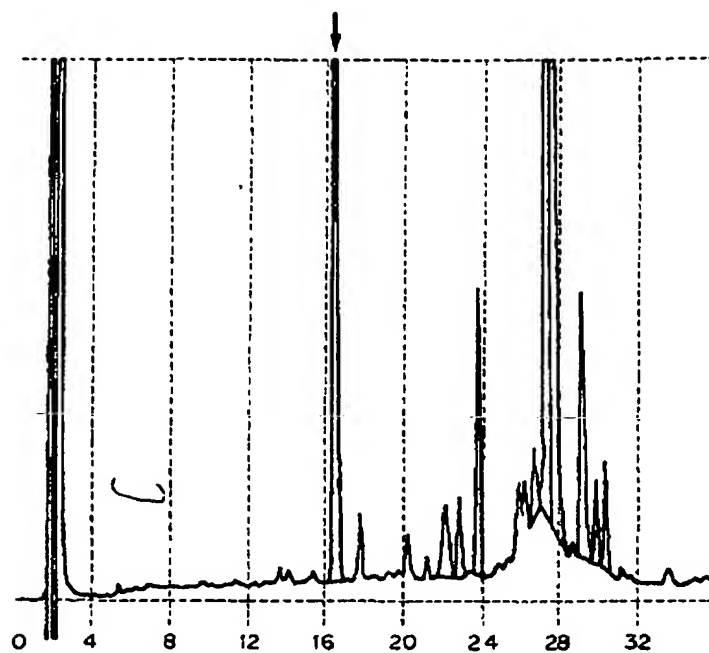
【第 17 図】



【第 19 図】



【第20図】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵
C12R 1:19)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(56)参考文献 特開 昭58-69897 (J P, A)
特開 昭60-69029 (J P, A)
特開 昭54-92696 (J P, A)